



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0034470

(51)⁷ A61K 47/36; A61K 9/48; A61K 9/14;
A61K 9/20; A61K 47/30; A61K 47/48

(13) B

(21) 1-2014-03185

(22) 22/03/2013

(86) PCT/US2013/033505 22/03/2013

(87) WO 2013/142792 26/09/2013

(30) 61/614,994 23/03/2012 US; 61/642,094 03/05/2012 US; 61/646,337 13/05/2012 US

(45) 26/12/2022 417

(43) 25/05/2015 326A

(73) ADVANCED BIONUTRITION CORPORATION (US)

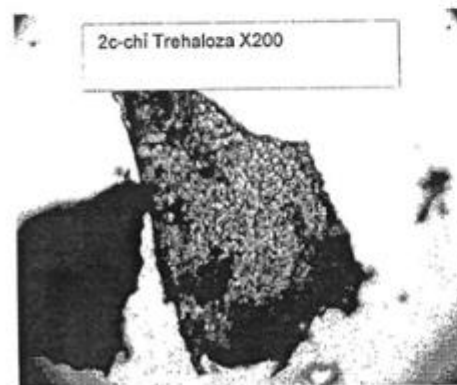
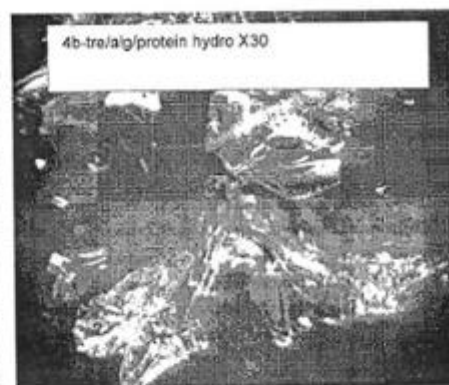
7155 Columbia Gateway Drive Suite H Columbia, MD 21046, United States of America

(72) HAREL, Moti (US); TANG, Qiong (US); RICE, Trisha (US); JENNINGS, Kimberly (US); CARPENTER, Brian (US); DREWES, Roger (US); RADITSIS, Elizabeth (US).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) CHẾ PHẨM ỔN ĐỊNH KHÔ Ở TRẠNG THÁI THỦY TINH VÔ ĐỊNH HÌNH VÀ SẢN PHẨM CHỨA CHẾ PHẨM NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm ổn định khô dùng cho vật liệu hoạt tính sinh học chứa đường và protein thủy phân, và có thể được tạo thành dạng viên nén hoặc dạng khác để tăng cường độ ổn định cho vật liệu hoạt tính sinh học. Chế phẩm chứa vật liệu hoạt tính sinh học có thể được sản xuất bằng phương pháp bao gồm các bước: (a) kết hợp vật liệu hoạt tính sinh học với các thành phần khác trong dung môi chứa nước để tạo ra hỗn hợp bùn sệt; (b) làm đông lạnh nhanh bùn sệt trong nitơ lỏng để tạo ra các hạt nhỏ, hạt, giọt nhỏ hoặc sợi đông lạnh rắn; (c) sấy sơ bộ bằng cách loại bỏ nước dưới chân không sản phẩm trong bước (b) trong khi giữ nó ở nhiệt độ cao hơn điểm kết đông của nó; và (d) sấy thứ cấp sản phẩm trong bước (c) ở chân không và nhiệt độ tối đa bằng 20°C hoặc cao hơn trong thời gian đủ để làm giảm hoạt độ nước xuống thấp hơn 0,3Aw.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm ổn định khô dùng cho vật liệu hoạt tính sinh học bao gồm đường và protein thủy phân, và có thể được tạo thành dạng viên nén hoặc các dạng khác tạo độ ổn định được tăng cường cho vật liệu hoạt tính sinh học. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm nêu trên được kết hợp với vật liệu hoạt tính sinh học.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Việc bảo quản cấu trúc và chức năng của vật liệu sinh học trong quá trình bảo quản lâu dài ở nhiệt độ và độ ẩm cao có tầm quan trọng cơ bản đối với các ngành công nghiệp thực phẩm, dinh dưỡng và dược phẩm. Vật liệu sinh học nhạy, như protein, enzym, tế bào, vi khuẩn và virus thường phải được bảo quản trong thời gian dài để sử dụng sau đó. Mặc dù nhiều phương pháp đã được thử nghiệm để ổn định vật liệu sinh học khi bảo quản, nhưng nhiều phương pháp không phù hợp với hoạt tính sinh học nhạy, như vi khuẩn và virus sống hoặc được giảm độc lực. Ví dụ, sấy đông lạnh truyền thống kết hợp các ứng suất do cả quy trình đông lạnh và sấy khô. Bước đông lạnh trong quy trình này có thể có hiệu quả không mong muốn, như sự biến tính của protein và enzym, và làm phá vỡ tế bào.

Tồn tại nhu cầu đối với chế phẩm ổn định là hữu ích cho nhiều loại vật liệu sinh học và tạo ra độ ổn định và bảo quản vượt trội cho các vật liệu sinh học trong thời gian dài ở nhiệt độ tăng cao và độ ẩm khác nhau, như có thể gặp phải trong quá trình vận chuyển và bảo quản vật liệu, trong khi vẫn giữ một lượng hoạt tính đáng kể khi bù nước. Cũng tồn tại nhu cầu để ổn định các chế phẩm có thể được sử dụng trong các ứng dụng tạo viên nén mà không làm mất hoạt tính quá mức của các vật liệu sinh học, nhiều vật liệu trong số đó nhạy với áp suất và nhiệt độ cao gặp phải trong khi tạo viên nén.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm ổn định khô cho vật liệu hoạt tính sinh học, bao gồm thành phần hydrat cacbon bao gồm oligosacarit với lượng nằm trong khoảng từ 10% đến 80%, disacarit với lượng nằm trong khoảng từ 5% đến 30% và polysacarit với lượng nằm trong khoảng từ 1% đến 10%; và thành phần protein bao gồm protein từ động vật hoặc thực vật được thủy phân với lượng nằm trong khoảng từ 0,5% đến 40%; dựa trên tổng trọng lượng của chế phẩm. Chế phẩm có thể được kết hợp với vật liệu hoạt tính sinh học.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất chế phẩm nêu trên được kết hợp với vật liệu hoạt tính sinh học, bao gồm các bước: (a) kết hợp vật liệu hoạt tính sinh học có ít nhất một thành phần hydrat cacbon và thành phần protein trong dung môi chứa nước để tạo ra hỗn hợp bùn sệt; (b) làm đông lạnh nhanh bùn sệt trong nitơ lỏng để tạo ra các hạt, hạt nhỏ, giọt nhỏ hoặc sợi đông lạnh rắn; (c) sấy sơ bộ bằng cách loại bỏ nước dưới chân không sản phẩm trong bước (b) trong khi giữ nó ở nhiệt độ cao hơn điểm kết đông của nó; và (d) sấy thứ cấp sản phẩm trong bước (c) ở chân không tối đa và nhiệt độ bằng 20°C hoặc cao hơn trong thời gian đủ để làm giảm hoạt độ nước xuống dưới 0,3Aw.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất viên nén, viên tròn hoặc viên vè nhỏ được tạo ra bằng cách nén chặt vật liệu hoạt tính sinh học nhạy được nhúng trong chế phẩm thủy tinh khô và vô định hình bao gồm một hoặc nhiều đường và một hoặc nhiều protein thủy phân, trong đó đường được bao gồm với lượng từ khoảng 10% đến 60% và protein thủy phân được bao gồm với lượng từ khoảng 1% đến 40% trên cơ sở tổng trọng lượng khô của chế phẩm.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất viên nén, viên tròn hoặc viên vè nhỏ được đề cập ở trên, trong đó phương pháp này bao gồm bước nén chặt vật liệu hoạt tính sinh học nhạy được nhúng trong chế phẩm thủy tinh khô và vô định hình, trong đó chế phẩm thủy tinh khô và vô

định hình này được tạo ra bằng quy trình bao gồm các bước: (a) kết hợp vật liệu hoạt tính sinh học có ít nhất một hoặc nhiều đường và một hoặc nhiều protein thủy phân trong dung môi chứa nước để tạo ra hỗn hợp bùn sệt; (b) làm đông lạnh nhanh bùn sệt trong nitơ lỏng để tạo ra hạt, hạt nhỏ, giọt nhỏ hoặc sợi đông lạnh rắn; (c) sấy sơ bộ bằng cách loại bỏ nước dưới chân không sản phẩm trong bước (b) trong khi giữ nó ở nhiệt độ cao hơn điểm kết đông của nó; và (d) sấy thứ cấp sản phẩm trong bước (c) ở chân không tối đa và ở nhiệt độ bằng 20°C hoặc cao hơn trong thời gian đủ để làm giảm hoạt độ nước xuống dưới 0,3Aw.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện độ ổn định gia tăng của vi khuẩn probiotic và vi khuẩn probiotic có bán trên thị trường trong chế phẩm khô theo sáng chế.

Fig.2 thể hiện ảnh hưởng của tỷ lệ mol khác nhau giữa chất tăng cường thủy tinh và hỗn hợp hydrat cacbon trong chế phẩm đối với sự ổn định của probiotic (*L. paracasei*) trong điều kiện bảo quản nhanh (37°C và 33%RH).

Fig.3 thể hiện ảnh hưởng của chế phẩm theo sáng chế đối với độ ổn định bảo quản của vi khuẩn probiotic *L. acidophilus*. Độ ổn định của vi khuẩn probiotic khô đã được thử nghiệm ở điều kiện bảo quản nhanh ở nhiệt độ 24°C và 33%RH trong thời gian 537 ngày.

Fig.4 thể hiện ảnh hưởng của các hợp chất tăng cường thủy tinh khác nhau đối với độ ổn định bảo quản của vi khuẩn probiotic *L. acidophilus*. Độ ổn định của vi khuẩn probiotic khô đã được thử nghiệm ở điều kiện bảo quản nhanh ở nhiệt độ 24°C và 43%RH trong thời gian 180 ngày.

Fig.5 thể hiện ảnh hưởng của tỷ lệ của chất thủy phân protein/đường khác nhau đối với độ ổn định bảo quản (35°C và 43%RH) của vi khuẩn probiotic *Bifidobacterium lactis*.

Fig.6 thể hiện sự tối ưu độ pH đối với độ ổn định tối đa của probiotic *L. rhamnosus* (điều kiện bảo quản nhanh ở nhiệt độ 40°C và 33%RH trong thời gian 8 tuần).

Fig.7 và Fig.8 thể hiện việc quan sát bằng mắt thường và kính hiển vi các chế phẩm được sấy khô khác nhau chứa chất nền và chất tạo hình thủy tinh khác nhau dưới dạng hạt đông lạnh rắn theo phương pháp của sáng chế.

Fig.9 thể hiện ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy *L. rhamnosus* dạng hạt tươi, đông lạnh hoặc môi trường nuôi cấy bột khô trên tổng số đếm CFU ban đầu của nó trong chế phẩm khô.

Fig.10 thể hiện ảnh hưởng của điểm kết đông của chế phẩm chứa *L. rhamnosus* dưới dạng hạt rắn đông lạnh trong nitơ lỏng hoặc máy làm lạnh sâu -80°C và dưới dạng hỗn hợp bùn sệt không đông lạnh ở nhiệt độ +4°C đối với tổng số đếm CFU ban đầu của vi khuẩn trong chế phẩm khô. Các kết quả này chỉ thể hiện ảnh hưởng của điểm kết đông của bùn sệt mà không có bước tẩy bổ sung trước khi sấy.

Fig.11 thể hiện ảnh hưởng của điểm kết đông của chế phẩm chứa *Bifidobacterium animalis* dưới dạng hạt rắn đông lạnh trong nitơ lỏng và dưới dạng hỗn hợp bùn sệt không đông lạnh ở nhiệt độ +4°C đối với tổng số đếm CFU ban đầu của vi khuẩn trong chế phẩm khô. Các kết quả chỉ thể hiện ảnh hưởng của điểm kết đông của bùn sệt mà không có bước tẩy bổ sung trước khi sấy.

Fig.12 thể hiện ảnh hưởng của khoảng thời gian tẩy dưới chân không của hạt rắn đông lạnh đối với tổng số đếm CFU ban đầu của *L. rhamnosus* trong chế phẩm khô.

Fig.13 thể hiện dữ liệu sấy khô chế phẩm trong máy sấy đông lạnh theo phương pháp của sáng chế.

Fig.14 cho thấy quy trình và tổn thất do sấy khô của *L. rhamnosus* trong chế phẩm và phương pháp sấy khô theo sáng chế.

Fig.15 cho thấy xu hướng ổn định của vi khuẩn probiotic khô, chế phẩm *L. rhamnosus* khi bảo quản ở nhiệt độ 40°C và độ ẩm tương đối là 33%.

Fig.16 thể hiện độ ổn định bảo quản trên kệ ở nhiệt độ 40°C và 43% RH của *L. acidophilus sp.* được sấy khô đông lạnh thông thường hoặc sau khi phối trộn trong chế phẩm và phương pháp theo sáng chế.

Fig.17 thể hiện độ ổn định bảo quản trên kệ ở nhiệt độ 40°C và 43% RH và ở nhiệt độ 30°C và 60% RH của *L. rhamnosus* sp. được sấy khô đông lạnh thông thường hoặc sau khi phối trộn trong chế phẩm và phương pháp theo sáng chế.

Fig.18 thể hiện ảnh hưởng của việc nén trong máy nén viên đối với khả năng sống và độ ổn định bảo quản ở nhiệt độ 40°C và 43% RH của probiotic *L. rhamnosus* được ổn định và bảo vệ trong chế phẩm theo sáng chế.

Fig.19 thể hiện ảnh hưởng của việc tạo viên nén đối với hỗn hợp đa vitamin và khoáng chất và sự tiếp xúc với bảo quản ở nhiệt độ 40°C và 43% RH đối với khả năng sống của probiotic *L. rhamnosus* được ổn định và bảo vệ trong chế phẩm theo sáng chế.

Fig.20 minh họa ảnh hưởng của việc nén trong máy nén viên đối với hoạt tính của các enzym proteaza và lipaza ở dạng tự do hoặc được bảo vệ trong chế phẩm theo sáng chế. Các enzym được tạo viên riêng lẻ hoặc được trộn với lượng bằng nhau và tiếp đó được tạo viên nén.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

Nên được hiểu rằng các thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích mô tả các phương án cụ thể, và không được dùng để giới hạn. Như được sử dụng trong bản mô tả này và các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo, dạng số ít gồm cả dạng số nhiều trừ khi nội dung được thể hiện rõ ràng theo cách khác. Do đó, ví dụ, việc viện dẫn đến "protein" bao gồm protein dạng số ít hoặc hỗn hợp của hai hoặc nhiều protein; việc viện dẫn đến "enzym", "vi khuẩn", v.v., bao gồm dạng số ít hoặc hỗn hợp của các loại khác nhau, và dạng tương tự.

Trong phần mô tả và yêu cầu bảo hộ của sáng chế, các thuật ngữ dưới đây sẽ được sử dụng phù hợp với các định nghĩa được đưa ra dưới đây.

"Thành phần có hoạt tính sinh học," "vật liệu hoạt tính sinh học" và "vật liệu sinh học" tất cả đều dùng để chỉ vi sinh vật hoặc thành phần có hoạt tính sinh học. Vật liệu hoạt tính sinh học thích hợp để sử dụng trong sáng chế gồm,

nhưng không giới hạn ở peptit, protein, enzym, hormon, axit nucleic, kháng thể, thuốc, vaccin, nấm men, nấm, vi khuẩn (probiotic hoặc các loài khác), vi khuẩn trong đất, virus và/hoặc hỗn dịch tế bào.

"Chế phẩm sinh học" dùng để chỉ các chế phẩm, ở dạng cho phép hoạt tính sinh học của thành phần hoặc tác nhân có hoạt tính sinh học có hiệu quả rõ rệt.

"Chất tăng cường thủy tinh," "hợp chất tăng cường thủy tinh," và "tác nhân tạo hình thủy tinh" được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả dùng để chỉ hợp chất hóa học có khả năng tạo ra cấu trúc vô định hình hoặc thủy tinh dưới nhiệt độ tới hạn, nhiệt độ chuyển tiếp thủy tinh (T_g). Trong quá trình hình thành cấu trúc thủy tinh, các chất sinh học có thể được nhúng vào bên trong cấu trúc thủy tinh. Chất tăng cường thủy tinh thích hợp để sử dụng theo sáng chế gồm, nhưng không giới hạn ở, muối của axit hữu cơ như axit lactic, axit ascorbic, axit maleic, axit oxalic, axit malonic, axit malic, axit succinic, axit xitric, axit gluconic, axit glutamic, và hợp chất tương tự. Muối có thể bao gồm cation như natri, kali, canxi, magie, phosphat và cation tương tự. Chất tăng cường thủy tinh hữu ích khác bao gồm protein, chất thủy phân protein, polypeptit và axit amin. Hỗn hợp của các chất tạo hình thủy tinh cũng được dự tính trong chế phẩm đơn lẻ. Quy trình được sử dụng để thu được cấu trúc thủy tinh dùng cho mục đích của sáng chế thường là kỹ thuật thăng hoa và/hoặc bay hơi dung môi. Tốt nhất là, các hợp chất là hợp chất GRAS được ưu tiên hơn các hợp chất không phải là GRAS.

"Đường" dùng để chỉ sacarit chủ yếu bao gồm cacbon, hydro, và oxy. Sacarit hữu ích bao gồm đường khử và đường không khử và rượu đường và disacarit. Hai monosacarit được liên kết cùng nhau tạo ra disacarit. Hai monosacarit được sử dụng để tạo ra disacarit có thể giống hoặc khác nhau. Các ví dụ về disacarit có thể được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế bao gồm sucroza, trehaloza, lactoza, maltoza, isomaltoza. Disacarit được sulfat hóa cũng có thể được sử dụng.

"Hydrat cacbon" hoặc "hợp chất polyhydroxy" dùng để chỉ sacarit chủ yếu bao gồm cacbon, hydro, và oxy. Sacarit thường bao gồm mạch khung đường có

đơn vị cấu trúc lặp lại được liên kết theo kiểu tuyến tính hoặc không tuyến tính, một số trong số đó chứa nhóm hóa học tích điện dương hoặc âm. Đơn vị lặp lại có thể nằm trong khoảng từ hai đến vài triệu. Sacarit hữu ích gồm đường khử và đường không khử, disacarit, oligosacarit, polysacarit hòa tan trong nước và dẫn xuất của chúng. Hai monosacarit được liên kết cùng nhau tạo ra disacarit. Hai monosacarit được sử dụng để tạo ra disacarit có thể giống hoặc khác nhau. Các ví dụ về disacarit có thể được sử dụng trong hỗn hợp hydrat cacbon theo sáng chế gồm sucroza, trehaloza, lactoza, maltoza, isomaltoza. Disacarit được sulfat hóa cũng có thể được sử dụng. Số lượng nhỏ các monosacarit được liên kết cùng nhau (thường từ ba đến hai mươi) tạo ra oligosacarit. Monosacarit được sử dụng để tạo ra oligosacarit có thể là đường thành phần giống hoặc khác nhau. Các ví dụ về oligosacarit thích hợp để sử dụng bao gồm inulin, maltodextrin, dextran, fructo-oligosacarit (FOS), galacto-oligosacarit (GOS), manan-oligosacarit (MOS) và sự kết hợp của chúng. Số lượng lớn các monosacarit được liên kết cùng nhau (thường nhiều hơn hai mươi) tạo ra polysacarit. Monosacarit được sử dụng để tạo ra polysacarit có thể là đường thành phần giống hoặc khác nhau. Các ví dụ về polysacarit thích hợp để sử dụng gồm, nhưng không giới hạn ở, metylxenluloza, hydroxypropylxenluloza, hydroxyetylxenluloza, và hypromeloza; tinh bột hòa tan được hoặc phân đoạn tinh bột, gồm xanthan, gồm guar, pectin, caragin, galactomanan, gồm gelan, bao gồm dẫn xuất bất kỳ của các hợp chất này, xenluloza axetat phtalat (cellulose acetate phthalate - CAP), carboxy-metyl-xenluloza, natri alginat, muối của axit alginic, hydroxyl propyl methyl xenluloza (hydroxyl propyl methyl cellulose - HPMC), keo gồm, gồm Locust bean, chitosan và dẫn xuất của chitosan, collagen, axit polyglycolic, tinh bột và tinh bột được cải biến và cyclodextrin.

"Protein thủy phân" dùng để chỉ protein phụ thuộc vào phản ứng thủy phân enzym hoặc axit đầy đủ hoặc một phần để tạo ra protein thủy phân có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 1kDa đến khoảng 50kDa. Theo một số phương án, thuật ngữ này được đề cập đến dưới dạng "protein thủy phân mạnh", ít nhất 20% cơ chất protein được chuyển hóa thành peptit có khối lượng phân tử

nằm trong khoảng từ 200 đến 2000 dalton. Protein thủy phân có thành phần axit amin gần giống như protein đầy đủ và có thể thu được từ bất kỳ nguồn thương mại nào. Protein thủy phân, không gây dị ứng có thể được sử dụng trong một cách thuận lợi trong một số thực phẩm cho người tiêu dùng quá nhạy cảm như trẻ sơ sinh và người già.

Chế phẩm hoặc hợp phần "ổn định" là chế phẩm trong đó vật liệu hoạt tính sinh học trong đó về cơ bản vẫn giữ được tính ổn định vật lý, ổn định hóa học và/hoặc hoạt tính sinh học của nó khi bảo quản. Độ ổn định có thể được đo ở điều kiện nhiệt độ và độ ẩm đã chọn trong khoảng thời gian đã chọn. Phân tích xu hướng có thể được sử dụng để ước tính thời hạn sử dụng dự kiến trước khi vật liệu thực sự được bảo quản trong khoảng thời gian đó. Ví dụ, đối với vi khuẩn sống, độ ổn định được xác định là thời gian cần thiết để mất đi 1 log CFU/g chế phẩm khô trong các điều kiện nhiệt độ, độ ẩm và khoảng thời gian xác định trước.

"Khả năng sống" đối với vi khuẩn, dùng để chỉ khả năng hình thành khuẩn lạc (CFU hoặc đơn vị hình thành khuẩn lạc (Colony Forming Unit)) trên môi trường dinh dưỡng thích hợp cho sự phát triển của vi khuẩn. Khả năng sống, đối với virus, dùng để chỉ khả năng lây nhiễm và sinh sản trong tế bào chủ thích hợp, dẫn đến sự tạo ra mảng trên lớp dày của tế bào chủ.

Điều kiện hoặc nhiệt độ trong phòng "xung quanh" là nhiệt độ ở thời điểm đã biết bất kỳ trong môi trường nhất định. Thông thường, nhiệt độ trong phòng xung quanh nằm trong khoảng từ 22 đến 25°C, áp suất khí quyển xung quanh, và độ ẩm xung quanh được đo dễ dàng và sẽ thay đổi tùy thuộc vào thời gian trong năm, điều kiện thời tiết và khí hậu, độ cao, v.v..

"Hoạt độ nước" hoặc " A_w " trong ngữ cảnh của chế phẩm dạng khô, dùng để chỉ tính sẵn có của nước và biểu thị trạng thái năng lượng của nước trong hệ thống. Nó được xác định là áp suất hơi của nước trên mẫu chia cho áp suất hơi của nước tinh khiết ở cùng nhiệt độ. Nước cất tinh khiết có hoạt độ nước chính xác bằng một, tức là, $A_w=1,0$.

"Độ ẩm tương đối" hoặc "RH" trong ngữ cảnh của độ ổn định bảo quản dùng để chỉ lượng hơi nước trong không khí ở nhiệt độ nhất định. Độ ẩm tương đối thường nhỏ hơn độ ẩm cần để bão hòa không khí và được biểu thị bằng phần trăm độ ẩm bão hòa.

"Khô" và các dạng khác của nó dùng để chỉ trạng thái vật lý được khử nước hoặc khan, tức là, về cơ bản thiếu chất lỏng. Bước sấy khô ví dụ, bao gồm sấy phun, sấy khô tầng sôi, sấy đông khô, và sấy chân không.

"Sấy đông khô" hoặc sấy đông lạnh dùng để chỉ việc điều chế chế phẩm ở dạng khô bằng cách đông lạnh và khử nước nhanh ở trạng thái đông lạnh (đôi khi được dùng để chỉ sự thăng hoa). Quy trình sấy đông khô diễn ra ở nhiệt độ dẫn đến sự kết tinh của đường. Quy trình này có thể diễn ra trong điều kiện chân không đủ để duy trì sản phẩm đông lạnh, theo một số phương án thấp hơn khoảng $<2000 \text{ mTORR}$ ($< 266,64 \text{ Pa}$).

Bước "loại bỏ nước sơ bộ" hoặc "sấy sơ bộ" hoặc "sấy khô chất lỏng", liên quan đến các quy trình được mô tả ở đây, dùng để chỉ việc sấy khô khử nước diễn ra từ thời điểm làm tan băng các hạt đông lạnh đến thời điểm bắt đầu sấy thứ cấp.

Thông thường, phần lớn quy trình sấy sơ bộ diễn ra bằng cách bay hơi trên diện rộng, trong khi nhiệt độ sản phẩm vẫn thấp hơn đáng kể so với nhiệt độ của nguồn nhiệt. Quy trình này có thể diễn ra dưới chân không đủ để duy trì sản phẩm được làm tan băng, theo một số phương án lớn hơn khoảng $>2000 \text{ mTORR}$ ($< 266,64 \text{ Pa}$).

"Bước sấy thứ cấp", liên quan đến các quy trình được mô tả ở đây, dùng để chỉ bước sấy khô diễn ra ở nhiệt độ của chế phẩm gần nhiệt độ của nguồn nhiệt. Quy trình này có thể diễn ra trong điều kiện chân không đủ để làm giảm hoạt độ nước của chế phẩm, theo một số phương án nhỏ hơn khoảng $<1000 \text{ mTORR}$ ($< 133,32 \text{ Pa}$). Trong quy trình sấy khô chế phẩm điển hình, bước sấy thứ cấp làm giảm hoạt độ nước của chế phẩm xuống A_w bằng 0,3 hoặc nhỏ hơn.

Sáng chế gồm chế phẩm và phương pháp sấy khô để bảo quản vật liệu hoạt tính sinh học nhạy, như peptit, protein, hormon, axit nucleic, kháng thể,

thuốc, vaccin, nấm men, vi khuẩn (probiotic hoặc các loại khác), virus và/hoặc hỗn dịch tế bào, khi bảo quản.

Chế phẩm và phương pháp sấy khô theo sáng chế giải quyết vấn đề về việc cung cấp chế phẩm khô có hiệu quả kinh tế và có khả năng mở rộng quy mô công nghiệp có chứa vật liệu hoạt tính sinh học nhạy, như peptit, protein, hormon, axit nucleic, kháng thể, thuốc, vaccin, nấm men, vi khuẩn, virus và/hoặc hỗn dịch tế bào, có tuổi thọ kéo dài đáng kể ở trạng thái khô. Sáng chế đề xuất chế phẩm bảo quản và phương pháp sấy khô bao gồm vật liệu sinh học được bao quanh bởi cấu trúc thủy tinh vô định hình của hợp chất có độ hòa tan cao. Quy trình sấy khô bao gồm các bước: trộn vật liệu sinh học và chế phẩm trong bùn sệt lỏng, làm đông lạnh nhanh bùn sệt trong chế phẩm nêu trên trong nitơ lỏng tạo thành giọt nhỏ, sợi hoặc hạt, sau đó sấy khô vật liệu hoạt tính sinh học trong sự hình thành thủy tinh đường bằng cách làm bay hơi ẩm dưới chế độ áp suất giảm trong khi cấp nhiệt cho chế phẩm.

Sáng chế dựa trên khám phá đáng chú ý rằng vật liệu sinh học có thể được bảo vệ trong cấu trúc thủy tinh trong khi vẫn giữ được hoạt tính đáng kể. Khi vật liệu sinh học được kết hợp với hỗn hợp chế phẩm và được sấy khô theo sáng chế, có thể đạt được độ ổn định cao hơn trong khi tiếp xúc trong thời gian dài với điều kiện nhiệt độ và độ ẩm khắc nghiệt. Sáng chế bao gồm chế phẩm chứa vật liệu sinh học, hỗn hợp chứa hydrat cacbon hòa tan và muối của axit carboxylic tăng cường thủy tinh. Chế phẩm theo sáng chế vốn đã khác nhau về cấu trúc vật lý và chức năng của chúng so với các chế phẩm giống đường cô đặc hoặc không sệt được làm khô đơn giản trong quy trình sấy đông lạnh thông thường. Ví dụ, patent Mỹ số 6919172 bộc lộ chế phẩm bột được sol khí hóa sử dụng trong phổi, chứa hỗn hợp của các hydrat cacbon và natri xitrat khác nhau. Tuy nhiên, chế phẩm được mô tả trong patent này thiếu hợp chất protein bổ sung cần thiết để tăng độ ổn định và để hình thành cấu trúc vật lý mong muốn trong khi sấy khô các dung dịch có nồng độ đường cao. Chế phẩm mong muốn trong patent này cũng thiếu cấu trúc hydrogel hoặc sền sệt, cho phép sấy khô hiệu quả dung dịch đã rải đông hoặc chưa đông lạnh để tăng cường sự hình

thành thủy tinh. Ngược lại, chế phẩm và quy trình sấy theo sáng chế khắc phục tất cả các vấn đề này trong khi đạt được độ ổn định vượt trội của vật liệu sinh học. Các giải pháp kỹ thuật trước đây cũng thiếu thành phần carboxylic bổ sung đóng vai trò hiệp đồng với protein thủy phân để bảo vệ và ổn định vật liệu sinh học.

Cấu trúc thủy tinh tăng cường thường đạt được trong tình trạng kỹ thuật bằng cách tạo bột hoặc đun sôi dung dịch trong chân không để hỗ trợ cho việc sấy khô hiệu quả. Bước tạo bột thường dẫn đến việc dung dịch sôi và phun trào mạnh dung dịch, là hậu quả không tránh khỏi khi sấy khô dung dịch chưa đông lạnh, và kết quả là chỉ là có thể đạt được dung tích nạp dung dịch trong lọ nhỏ hoặc bình rất thấp (xem ví dụ patent Mỹ Số 6,534,087, trong đó độ dày của sản phẩm được tạo bột cuối cùng nhỏ hơn 2mm). Chế phẩm và phương pháp sấy theo sáng chế tránh đun sôi và tạo bột chế phẩm, nhờ đó cho phép nạp vật liệu cao hơn nhiều trên mỗi khu vực sấy và, kết quả là, có thể mở rộng quy mô để sản xuất số lượng lớn vật liệu mà không cần sử dụng các bình và khay hoặc thiết bị được thiết kế đặc biệt.

Nhiều loại vật liệu sinh học có thể được sử dụng với chế phẩm theo sáng chế để tạo thành môi trường bảo quản trong nước theo sáng chế. Môi trường bảo quản này sau đó có thể phụ thuộc vào quy trình sấy theo sáng chế để tạo thành bột khô ổn định của vật liệu sinh học. Các vật liệu sinh học này, gồm nhưng không giới hạn ở: enzym, như enzym tuyến tụy, lipaza, amylaza, proteaza, phitaza, lactat dehydrogenaza; protein, như insulin; vacxin; virus, như adenovirus; tế bào, gồm tế bào prokaryot (bao gồm vi khuẩn và nấm) và tế bào eukaryot, vật liệu sinh học khác, bao gồm thuốc, axit nucleic, peptit, hormon, vitamin, carotenoid, khoáng chất, kháng sinh, chất khử trùng, thuốc diệt nấm, thuốc diệt cỏ, thuốc trừ sâu, chất diệt tinh trùng, kháng thể và vi nang lipid.

Vi khuẩn probiotic đã được chứng minh là có lợi đặc biệt từ các chế phẩm và phương pháp sấy theo sáng chế. Bột probiotic khô ổn định được điều chế theo chế phẩm và phương pháp theo sáng chế bao gồm các bước: trộn môi trường nuôi cấy mới, đông lạnh hoặc khô chứa vi khuẩn probiotic với hỗn hợp

chứa hydrat cacbon và hợp chất tăng cường thủy tinh, làm đông lạnh nhanh chế phẩm sệt trong nitơ lỏng để tạo ra giọt nhỏ, sợi hoặc hạt rắn đông lạnh, và sấy khô bằng cách ban đầu đưa đủ chân không để làm tăng nhiệt độ của chế phẩm cao hơn điểm kết đông và cấp nguồn nhiệt bằng 20°C và cao hơn để hỗ trợ cho việc loại bỏ sơ bộ nước. Duy trì nhiệt độ của chế phẩm cao hơn điểm kết đông có thể được thực hiện bằng cách điều chỉnh chân không và bằng cách dẫn nhiệt vào chế phẩm. Để hoàn thành quy trình sấy và giảm hơn nữa hoạt độ nước của chế phẩm dưới A_w bằng 0,3 hoặc thấp hơn, bước sấy thứ cấp được áp dụng ở chân không tối đa và ở nhiệt độ tăng cao hơn 70°C. Chế phẩm như vậy có thể giữ lại độ ổn định trong điều kiện bảo quản ở nhiệt độ 40°C và 33%RH trong thời gian 30 ngày hoặc nhiều hơn, như được thể hiện trên Fig.15.

Các vi sinh vật sống như vi khuẩn probiotic trong viên nén đã chứng minh là có lợi đặc biệt từ các chế phẩm và phương pháp sấy theo sáng chế. Bột sinh học khô ổn định được điều chế theo chế phẩm và phương pháp theo sáng chế bao gồm các bước: trộn môi trường nuôi cấy mới, đông lạnh hoặc khô chứa sinh vật tế bào đơn với hỗn hợp chứa đường, protein thủy phân và chất chống oxy hóa và có thể chứa lượng bổ sung của polysacarit và oligosacarit và hợp chất tăng cường thủy tinh, làm đông lạnh nhanh chế phẩm sệt trong nitơ lỏng để tạo ra giọt nhỏ, sợi hoặc hạt rắn đông lạnh, bay hơi nước bằng cách ban đầu đưa đủ chân không để làm tăng nhiệt độ chế phẩm cao hơn điểm kết đông của nó và cấp nguồn nhiệt bằng 20°C và cao hơn để hỗ trợ cho loại bỏ sơ bộ nước. Duy trì nhiệt độ của chế phẩm cao hơn điểm kết đông có thể được thực hiện bằng cách điều chỉnh chân không và bằng cách dẫn hoặc bức xạ nhiệt vào chế phẩm. Để hoàn thành quy trình sấy khô và giảm hơn nữa hoạt độ nước của chế phẩm thấp hơn A_w dưới 0,3 hoặc thấp hơn, bước sấy thứ cấp được áp dụng ở chân không tối đa và ở nhiệt độ cao lên đến 70°C.

Chế phẩm theo sáng chế

Theo một số phương án, chế phẩm bao gồm hỗn hợp hydrat cacbon của di, oligo và poly-sacarit, trong đó vật liệu hoạt tính sinh học được nhúng vào. Các ví dụ về polysacarit thích hợp, gồm nhưng không giới hạn ở, xenluloza axetat

phtalat (cellulose acetate phthalate - CAP), carboxy-metyl-xenluloza, pectin, natri alginat, muối của axit alginic, hydroxyl propyl metyl xenluloza (hydroxyl propyl methyl cellulose - HPMC), metyl xenluloza, caraginan, gôm gelan, gôm guar, keo gôm, gôm xanthan, gôm Locust bean, chitosan và dẫn xuất của chitosan, collagen, axit polyglycolic, tinh bột và tinh bột được cải biến. Các ví dụ về oligosacarit thích hợp, gồm nhưng không giới hạn ở, xyclodextrin, fructan, inulin, FOS, maltodextrin, dextran, v.v.; và hỗn hợp của chúng. Các ví dụ về disacarit thích hợp, gồm nhưng không giới hạn ở, lactoza, trehaloza, sucroza, v.v.. Theo một phương án cụ thể, polysacarit được nêu làm ví dụ thích hợp là natri alginat hoặc gôm gelan. Theo các phương án khác, chế phẩm chứa natri alginat với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 20% tính theo phần trăm trọng lượng của tổng chất khô.

Theo một số phương án, hỗn hợp hydrat cacbon chứa polysacarit với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10%, oligosacarit với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 10%, và disacarit với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 90% tính theo phần trăm trọng lượng của tổng chất khô. Theo một phương án bổ sung, hỗn hợp hydrat cacbon bao gồm di, oligo và poly-sacarit theo tỷ lệ trọng lượng nằm trong khoảng từ 10:0,1 đến 4:0,1-2, hoặc trong đó tỷ lệ trọng lượng của disacarit/oligosacarit/polysacarit nằm trong khoảng từ 10:0,2:0,1 đến khoảng 10:2:1.

Theo một số phương án, phân đoạn disacarit trong hỗn hợp hydrat cacbon bao gồm đường và rượu đường khác nhau. Disacarit thích hợp là các disacarit không kết tinh và/hoặc làm hư hại hoặc làm mất ổn định vật liệu hoạt tính sinh học trong chế phẩm ở nhiệt độ kết đông (ví dụ, thấp hơn nhiệt độ -20°C) và trong khi loại bỏ nước. Ví dụ, vật liệu hoạt tính sinh học có thể được sấy khô với sự có mặt của đường tạo hình thủy tinh như sucroza, lactoza hoặc trehaloza để thúc đẩy việc duy trì cấu trúc phân tử trong suốt quy trình sấy khô và mang lại độ cứng cấu trúc cho chất nền vô định hình ở trạng thái khô. Disacarit thích hợp sẽ thay thế hiệu quả nước lượng nước bị mất đi trong quy trình sấy khô, để ngăn ngừa sự tổn thương màng tế bào và sự biến tính của các enzym (xem bài

đánh giá của Crowe et al., 1998). Các chức năng khác của disacarit trong chế phẩm có thể bao gồm chức năng bảo vệ vật liệu hoạt tính sinh học khỏi tiếp xúc với ánh sáng gây hại, oxy, tác nhân oxy hóa và độ ẩm. Disacarit thích hợp phải hòa tan dễ dàng trong dung dịch. Trehaloza là chất bảo vệ đặc biệt hấp dẫn do nó là disacarit không khử được tìm thấy ở thực vật và sinh vật sống (ví dụ, vi khuẩn, nấm và động vật không xương sống như sâu bọ và giun tròn) vẫn ở trạng thái ngủ trong thời kỳ hạn hán. Trong một số trường hợp, nó có thể có lợi khi gồm hai hoặc nhiều disacarit khác nhau như hỗn hợp của trehaloza và sucroza để ức chế sự hình thành tinh thể, để tăng cường độ ổn định của chế phẩm vật liệu hoạt tính sinh học sấy khô trong điều kiện bảo quản trong khoảng thời gian kéo dài và làm giảm chi phí.

Theo một số phương án, phân đoạn oligosacarit trong hỗn hợp hydrat cacbon bao gồm inulin, maltodextrin, dextran, fructo-oligosacarit (FOS), galacto-oligosacarit (GOS), manan-oligosacarit (MOS) và sự kết hợp của chúng. Các oligosacarit giảm thiểu một số vấn đề liên quan đến việc sử dụng một mình trehaloza là chất bảo vệ cho nhiều vật liệu sinh học được bảo quản. Mặc dù rất hiệu quả trong việc bảo vệ vật liệu sinh học trong khi khử nước và bù nước, một mình trehaloza là chất ổn định không mang lại sự ổn định bảo quản mong muốn trong khoảng thời gian kéo dài, đặc biệt là ở nhiệt độ cao và/hoặc môi trường ẩm. Vấn đề này đã được giải quyết theo sáng chế bằng cách bổ sung oligosacarit, ví dụ inulin, vào hỗn hợp hydrat cacbon.

Tỷ lệ khối lượng được nêu làm ví dụ thích hợp của sacarit trong hỗn hợp hydrat cacbon là từ 10:0,1 đến 10:0,1-2 disacarit/oligosacarit/polysacarit và theo một số phương án, trong đó tỷ lệ trọng lượng của disacarit/oligosacarit/polysacarit nằm trong khoảng từ 10:0,2:0,1 đến khoảng 5:10:1. Theo một số phương án, hỗn hợp hydrat cacbon bao gồm disacarit với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 90%, oligosacarit với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 10% và polysacarit với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10%, tính theo phần trăm trọng lượng của tổng chất khô. Theo các phương án khác, hỗn hợp hydrat cacbon chứa disacarit với lượng nằm trong khoảng từ 10

đến 50%, oligosacarit với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 80% và polysacarit với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10%, theo phần trăm về trọng lượng vật phẩm khô tổng số.

Theo một phương án cụ thể, chế phẩm chứa hỗn hợp của oligosacarit. Hỗn hợp oligosacarit giảm thiểu một số vấn đề liên quan đến việc sử dụng một oligosacarit đơn lẻ dưới dạng vật liệu tăng cường thủy tinh trong chế phẩm. Mặc dù rất hiệu quả để làm tăng nhiệt độ chuyển tiếp thủy tinh, nhưng oligosacarit vẫn có xu hướng kết tinh và kết tủa nhanh và nhờ đó làm vỡ vụn cấu trúc thủy tinh vô định hình, đặc biệt là ở nhiệt độ cao và/hoặc môi trường ẩm. Vấn đề này được giải quyết theo sáng chế bằng cách bổ sung hỗn hợp chứa oligosacarit thay vì loại oligosacarit đơn lẻ, theo một số phương án, hỗn hợp chứa fructan và dextrin DE thấp. Theo một số phương án, hỗn hợp hydrat cacbon chứa fructan với lượng nằm trong khoảng từ 5 đến 40% và DE dextrin thấp với lượng nằm trong khoảng từ 5 đến 40% tính theo phần trăm trọng lượng của tổng chất khô.

Một chế phẩm thích hợp chứa thành phần hydrat cacbon với lượng nằm trong khoảng từ khoảng 0,5% đến khoảng 90% chứa ít nhất một di, oligo và poly-sacarit và thành phần protein chứa protein thủy phân với lượng nằm trong khoảng từ khoảng 0,5% đến khoảng 40%. Theo một số phương án, chế phẩm chứa thành phần hydrat cacbon với lượng nằm trong khoảng từ khoảng 30% đến khoảng 70% và thành phần chất tăng cường thủy tinh với lượng nằm trong khoảng từ khoảng 1% đến khoảng 40% như protein thủy phân protein và axit carboxylic, trong đó thành phần hydrat cacbon chứa disacarit với lượng nằm trong khoảng từ khoảng 10% đến khoảng 90% hoặc từ khoảng 40% đến 80%; oligosacarit với lượng nằm trong khoảng từ khoảng 1% đến khoảng 10% hoặc từ khoảng 5% đến khoảng 0%; và polysacarit với lượng nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 đến khoảng 0% hoặc từ khoảng 5% đến khoảng 10%. Chế phẩm còn chứa muối của axit hữu cơ được xem là thành phần chất tăng cường thủy tinh và chứa từ khoảng 0,5% và 20% axit carboxylic, dựa trên tổng trọng lượng của chế phẩm.

Theo một phương án khác, chế phẩm chứa hỗn hợp của natri alginat và oligosacarit với tỷ lệ trọng lượng bằng 1:1-10, hoặc 1:1-5, của natri alginat/oligosacarit.

Theo một phương án khác của sáng chế, chế phẩm được liên kết ngang với ion kim loại hóa trị hai để tạo ra hydrogel rắn. Theo một số phương án, chế phẩm hydrogel liên kết ngang được tạo ra bằng cách tán nhỏ hoặc ép đùn bùn sệt trong bồn chứa dung dịch ion kim loại hóa trị hai hoặc bằng cách bổ sung ion kim loại hóa trị hai trực tiếp vào bùn sệt và cho phép chế phẩm này hóa rắn và tạo ra hydrogel. Chế phẩm hydrogel tiếp đó được đông lạnh nhanh và sấy khô theo các phương pháp sấy khô của sáng chế.

Theo các phương án khác, chế phẩm chứa lượng đáng kể của hợp chất tăng cường thủy tinh bao gồm muối của các axit hữu cơ như axit lactic, axit ascorbic, axit maleic, axit oxalic, axit malonic, axit malic, axit succinic, axit xitric, axit gluconic, axit glutamic, và axit tương tự. Muối có thể bao gồm các cation như natri, kali, canxi, magie, và cation tương tự. Các ví dụ bao gồm natri xitrat, natri lactat, natri maleat, magie gluconat, natri ascorbat, và hợp chất tương tự. Muối có nhiệt độ chuyển tiếp thủy tinh (T_g) cao và độ hòa tan cao được ưu tiên. Axit hữu cơ được nêu làm ví dụ bao gồm axit xitric và muối của nó (ví dụ, natri hoặc kali xitrat, loại nước trinatri xitrat) và axit ascorbic và muối của nó (ví dụ, natri ascorbat, kali ascorbat, magie ascorbat). Ví dụ, theo một số phương án, chế phẩm theo sáng chế bao gồm hỗn hợp hydrat cacbon bao gồm di, oligo và polysacarit và ion của các axit hữu cơ như axit xitric và/hoặc axit ascorbic.

Lượng chất tăng cường thủy tinh được sử dụng trong chế phẩm sẽ thay đổi phụ thuộc vào toàn bộ chế phẩm và điều kiện bảo quản sấy được dự kiến của nó. Nói chung, lượng hợp chất tăng cường thủy tinh trong chế phẩm lớn hơn hai (2) phần trăm trọng lượng của tổng chất khô trong khi độ pH của dung dịch hoặc thể phân tán được duy trì ở mức kiềm nhẹ (độ pH nằm trong khoảng từ 7 đến 7,5). Mà không bị ràng buộc theo lý thuyết, được tin rằng chức năng của hợp chất tăng cường thủy tinh ở hàm lượng tương đối cao như được mô tả ở đây

không chỉ góp phần vào cấu trúc vô định hình mong muốn và cấu trúc thủy tinh cứng của chế phẩm khô tạo thành, mà còn bảo vệ vật liệu hoạt tính sinh học khỏi tiếp xúc với ánh sáng gây hại, oxy, tác nhân oxy hóa và độ ẩm. Chế phẩm được nêu làm ví dụ thích hợp chứa hợp chất tăng cường thủy tinh với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 20% hoặc từ khoảng 2 đến 10% theo phần trăm trọng lượng của tổng chất khô.

Chất tăng cường thủy tinh thích hợp khác được chứa trong chế phẩm để làm tăng thêm độ ổn định của nó bao gồm protein, chất thủy phân protein, polypeptit và axit amin. Các chất này bao gồm gelatin, albumin, protein dịch sữa, protein đậu tương, casein, caseinat, globulin miễn dịch, protein đậu tương, protein đậu Hà lan, protein hạt bông hoặc thực phẩm khác và protein từ bơ sữa hoặc protein thực vật và/hoặc chất thủy phân của chúng, hoặc protein thủy phân bất kỳ khác. Ví dụ về poly axit amin bao gồm polyalanin, polyarginin, polyglyxin, axit polyglutamic và hợp chất tương tự. Axit amin hữu ích bao gồm lysin, glyxin, alanin, arginin hoặc histidin, cũng như axit amin kỵ nước (tryptophan, tyrosin, leuxin, phenylalanin, v.v..) và metylamin như betain.

Theo một số phương án, casein hoặc protein đậu Hà lan hoặc casein thủy phân hoặc protein đậu Hà lan thủy phân, được sử dụng. Theo một số phương án phân đoạn protein thủy phân trong hỗn hợp chế phẩm bao gồm protein thủy phân một phần hoặc thủy phân mạnh, polypeptit và axit amin. Như được sử dụng ở đây, protein thủy phân mạnh là protein thu được bằng sự thủy phân enzym mạnh thông qua việc sử dụng proteaza để cải biến (phá vỡ) protein. Theo một số phương án, protein từ động vật hoặc thực vật được thủy phân như casein, dịch sữa, đậu tương, hoặc protein đậu Hà lan, hoặc casein thủy phân mạnh hoặc protein đậu Hà lan. Một vài phương án sử dụng protein thủy phân mạnh có hơn 80% peptit mạch ngắn có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 1kDa đến khoảng 50kDa và ít nhất 20% cơ chất protein được chuyển hóa thành peptit có khối lượng phân tử nằm trong khoảng từ 200 đến 2000 dalton. Mà không bị ràng buộc theo lý thuyết, được tin rằng hỗn hợp tạo thành từ đường và protein thủy phân mạnh như được mô tả ở đây cho phép sấy khô

nhanh hơn và góp phần vào cấu trúc thủy tinh cứng và vô định hình mong muốn của chế phẩm khô tạo thành. Protein thủy phân enzym có thể được điều chế bằng các phương pháp đã biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực liên quan hoặc có thể thu được từ nguồn thương mại. Chế phẩm được nêu làm ví dụ thích hợp chứa protein thủy phân mạnh với lượng nằm trong khoảng từ 5 đến 40%, tính theo phần trăm trọng lượng của tổng chất khô.

Lượng protein tổng số được nêu làm ví dụ thích hợp, protein thủy phân hoặc protein thủy phân mạnh và axit amin trong chế phẩm khô với lượng nằm trong khoảng từ 1% đến khoảng 40%, hoặc từ khoảng 5% đến khoảng 40%, hoặc từ khoảng 10% đến khoảng 30% tổng khối lượng của hỗn hợp khô.

Nên lưu ý rằng lượng thích hợp của chất tăng cường thủy tinh trong chế phẩm có thể phụ thuộc vào các đặc tính mong muốn của chế phẩm khô. Ví dụ, chế phẩm chứa hỗn hợp hydrat cacbon và protein hoặc chất thủy phân protein có thể được sử dụng để tăng cường độ ổn định hóa học của vật liệu sinh học trong khi được bảo quản ở nhiệt độ vừa phải và độ ẩm tương đối, như 25°C và 25% RH. Việc xác định lượng chất tăng cường thủy tinh thích hợp, và cụ thể là tỷ lệ tương đối giữa disacarit và oligosacarit, nên được tạo ra theo điều kiện bảo quản mong muốn. Ví dụ, chế phẩm chứa tỷ lệ cao của disacarit/oligosacarit có thể được sử dụng để tăng cường độ ổn định hóa học của vật liệu sinh học trong khi được bảo quản ở nhiệt độ vừa phải và độ ẩm tương đối, như 25°C và 25% RH. Chế phẩm chứa tỷ lệ thấp của disacarit/oligosacarit có thể được sử dụng để tăng cường độ ổn định hóa học của vật liệu sinh học trong khi được bảo quản dưới nhiệt độ cao và độ ẩm tương đối, như nhiệt độ 30°C và 40% RH hoặc cao hơn.

Ion axit ascorbic có thể được ưu tiên theo một số phương án dưới dạng chất tăng cường thủy tinh để có thêm lợi ích là ổn định khi tiếp xúc ở nhiệt độ và độ ẩm cao hơn. Theo cách khác, theo một số phương án, hỗn hợp của ion xitrat và/hoặc ascorbat với chất tăng cường thủy tinh khác, như protein hoặc chất thủy phân protein, được ưu tiên hơn.

Theo một số phương án, chế phẩm chứa hỗn hợp của đường và protein thủy phân, trong đó vật liệu hoạt tính sinh học được nhúng vào. Các ví dụ về đường thích hợp, gồm nhưng không giới hạn ở disacarit như lactoza, trehaloza, sucroza và hỗn hợp của chúng. Ví dụ về protein thủy phân thích hợp, gồm nhưng không giới hạn ở gelatin, albumin, protein dịch sữa, protein đậu tương, casein, caseinat, globulin miễn dịch, protein đậu tương, protein đậu Hà lan, protein hạt bông thủy phân mạnh hoặc protein thủy phân mạnh bất kỳ khác từ nhà máy sản xuất bơ sữa, có nguồn gốc động vật hoặc thực vật và hỗn hợp của chúng. Tổng lượng đường được nêu làm ví dụ thích hợp trong chế phẩm khô nằm trong khoảng từ 10% đến khoảng 80% tổng khối lượng của hỗn hợp khô, hoặc nằm trong khoảng từ 10% đến khoảng 60% khối lượng khô.

Theo một phương án được nêu làm ví dụ, chất tạo hình thủy tinh bao gồm hỗn hợp của disacarit và protein thủy phân. Theo một phương án cụ thể, chất tạo hình thủy tinh thích hợp được nêu làm ví dụ là hỗn hợp của trehaloza và protein thủy phân. Theo một số phương án, chế phẩm chứa trehaloza với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 90% và protein thủy phân với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 30%, hoặc trehaloza với lượng nằm trong khoảng từ 20 đến 80% và protein thủy phân với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 20%, hoặc trehaloza với lượng nằm trong khoảng từ 40 đến 80% và protein thủy phân với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 20%, tính theo phần trăm trọng lượng của tổng chất khô.

Lý tưởng là, các hợp chất là hợp chất thường được công nhận là an toàn (Generally Recognized As Safe - GRAS) được ưu tiên hơn các hợp chất không phải GRAS. Các hợp chất khác bao gồm muối tá dược như magie sulfat; rượu polyhydric như rượu ba lần hoặc rượu đường cao, (ví dụ, glycerin, erytritol, glyxerol, arabitol, xylitol, sorbitol và manitol); propylen glycol; polyetylen glycol; pluronic; chất hoạt động bề mặt; và hỗn hợp của chúng.

Theo một số phương án, vật liệu sinh học bao gồm vi khuẩn sống (ví dụ, vi khuẩn probiotic). Ví dụ về vi sinh vật thích hợp gồm, nhưng không giới hạn ở, nấm men như *Saccharomyces*, *Debaromyces*, *Candida*, *Pichia* và *Torulopsis*,

nấm mốc như *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Penicillium* và *Torulopsis* và vi khuẩn như giống *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Melissococcus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Kocuriaw*, *Staphylococcus*, *Peptostrepococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Oenococcus* và *Lactobacillus*. Ví dụ cụ thể về các vi sinh vật probiotic thích hợp sẽ được thể hiện bởi các loài dưới đây và bao gồm tất cả các mẫu sinh vật nuôi cấy trong số các loài đó: *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Bacillus coagulans*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. mesentericus*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. natto*, *Bacteroides amylophilus*, *Bac. capillosus*, *Bac. ruminicola*, *Bac. suis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *B. animalis*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. longum*, *B. pseudolongum*, *B. thermophilum*, *Candida pintolepesii*, *Clostridium butyricum*, *Enterococcus cremoris*, *E. diacetylactis*, *E. faecium*, *E. intermedius*, *E. lactis*, *E. muntidi*, *E. thermophilus*, *Escherichia coli*, *Kluyveromyces fragilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. alimentarius*, *L. amylovorus*, *L. crispatus*, *L. brevis*, *L. case 4*, *L. curvatus*, *L. cellobiosus*, *L. delbrueckii* ss. *bulgaricus*, *L. farciminis*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. johnsonii*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. sakei*, *L. salivarius*, *Leuconostoc mesenleroides*, *P. cereviseae* (*damnosus*), *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceus*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Prop. shermanii*, *Saccharomyces cereviseae*, *Staphylococcus carnosus*, *Staph. xylosus*, *Streptococcus infantarius*, *Strep. salivarius* ss. *thermophilus*, *Strep. Thermophilus* và *Strep. lactis*.

Phương pháp điều chế chế phẩm

Một quy trình trộn vật liệu sinh học và chế phẩm thích hợp bằng cách bổ sung hỗn hợp chế phẩm khô tổng số trong môi trường nuôi cấy đặc hoặc dung dịch môi trường chứa vật liệu sinh học. Khối lượng trọng lượng của vật liệu sinh học trong môi trường nuôi cấy thường nằm trong khoảng từ 5% đến 30% trọng lượng/thể tích, hoặc nằm trong khoảng từ 10% đến 20% trọng lượng/thể tích. Khối lượng trọng lượng bổ sung của hỗn hợp chế phẩm trong môi trường

nuôi cấy thường nằm trong khoảng từ 10% đến khoảng 60%, hoặc nằm trong khoảng từ 20% đến khoảng 40%. Hàm lượng chất rắn cuối cùng trong bùn sệt được trộn nằm trong khoảng từ 20% đến khoảng 60% và cụ thể hơn là nằm trong khoảng từ 30% đến khoảng 50%. Theo một số phương án, dung dịch được trộn ở nhiệt độ trong phòng hoặc được làm ấm nhẹ để hỗ trợ sự hòa tan các vật liệu trong dung dịch sệt (ví dụ, nằm trong khoảng từ 20°C đến 40°C). Theo một biến thể của sáng chế, tổng lượng của hỗn hợp hydrat cacbon trong chế phẩm được điều chỉnh để đạt được độ nhớt và tỷ trọng mong muốn của chế phẩm cho phép sấy khô hiệu quả trong khi tránh được sự hình thành cao su hoặc tạo bọt quá mức có thể xuất hiện trong bước sấy khô. Độ nhớt của bùn được nêu làm ví dụ thích hợp nằm trong khoảng từ 1000cP đến khoảng 500000cP, hoặc nằm trong khoảng từ 5000cP đến khoảng 300000cP. Độ nhớt và tỷ trọng mong muốn của bùn sệt cuối cùng có thể đạt được bằng các phương pháp bất kỳ đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, điều chỉnh nhẹ lượng polysacarit trong hỗn hợp hydrat cacbon hoặc bằng cách khử khí hoặc phun khí như không khí, nitơ, cacbon dioxit, agon v.v..

Bùn sệt của vật liệu sinh học theo sáng chế thường được làm lạnh nhanh đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ -30°C đến -180°C, hoặc chế phẩm được làm đông lạnh nhanh trong nitơ lỏng bằng cách tán nhỏ, chảy nhỏ giọt hoặc phun vào bồn nitơ lỏng. Thu các hạt, hạt nhỏ, sợi hoặc giọt nhỏ từ bồn nitơ lỏng và sấy khô trong máy sấy đông lạnh hoặc máy sấy chân không, hoặc theo cách khác bảo quản chúng trong thiết bị đông lạnh sâu (nằm trong khoảng từ -30°C đến -80°C) để sử dụng sau đó dưới dạng đông lạnh hoặc để sấy khô sau đó, bằng cách sấy phun.

Nói chung, kỹ thuật xử lý sấy khô hữu ích bao gồm bước sấy phun; hoặc sấy bay hơi dung dịch không đông lạnh trong lò chân không hoặc máy bay hơi ly tâm ở nhiệt độ cao hơn điểm kết đông của bùn sệt (từ -20 đến 50°C), sau đó bằng cách nghiền thành cỡ hạt mong muốn. Các hạt bột tạo thành giống thủy tinh chủ yếu là vật liệu thủy tinh phủ vật liệu sinh học. Ưu điểm của lớp phủ vật liệu sinh học bằng vật liệu thủy tinh là để làm tăng độ ổn định vật lý của sản

phẩm và làm giảm phản ứng liên phân tử có hại trong hạt. Theo một phương án được nêu làm ví dụ thích hợp, các hạt đông lạnh được nạp lên khay và được chuyển ngay vào buồng sấy chân không trong đó quy trình sấy khô tiến hành theo ba bước chính bao gồm: (1) Bước ổn định cấu trúc và tẩy nhanh tùy ý các hạt đông lạnh dưới áp suất chân không nhỏ hơn $<2000\text{mTORR}$ ($<266,64\text{ Pa}$), (2) Bước sấy sơ bộ dưới chân không lớn hơn $>2000\text{mTORR}$ ($>266,64\text{ Pa}$) và ở nhiệt độ cao hơn điểm kết đông của bunn sệt, và (3) bước sấy thứ cấp và cuối cùng của vật liệu vô định hình thủy tinh dưới áp suất chân không hoàn toàn và nhiệt độ tăng cao trong thời gian đủ để làm giảm hoạt độ nước của chế phẩm sấy khô xuống còn $0,3A_w$ hoặc nhỏ hơn.

Theo một phương án cụ thể của sáng chế, chế phẩm sấy khô được kết hạt với hỗn hợp các chất béo được nấu chảy để thu được sự bảo quản tăng cường trong thời gian ngắn khi tiếp xúc với điều kiện nhiệt độ và độ ẩm khắc nghiệt.

Chế phẩm sinh học ổn định và được sấy khô có thể được sử dụng trực tiếp dưới dạng phiến nhỏ, hoặc được nghiền thành bột và được sàng đến cỡ hạt trung bình nằm trong khoảng từ $10\mu\text{m}$ đến khoảng $1000\mu\text{m}$. Chế phẩm này có thể được sử dụng trực tiếp cho động vật, bao gồm người, dưới dạng bột cô đặc, dưới dạng chất lỏng hoàn nguyên, (ví dụ, đồ uống), hoặc nó có thể được kết hợp dưới dạng phiến nhỏ hoặc dạng bột thành thực phẩm hoặc thức ăn cho gia súc hoặc sản phẩm nông nghiệp hiện nay.

Theo một số phương án, chế phẩm để điều chế bột khô hoặc đông lạnh ổn định chứa vật liệu sinh học theo sáng chế bao gồm hỗn hợp hydrat cacbon và chất tăng cường thủy tinh. Vật liệu này, khi được trộn với vật liệu hoạt tính sinh học, tạo ra hạt, sợi hoặc giọt nhỏ trong nitơ lỏng và có thể được sấy khô hiệu quả trong cấu trúc thủy tinh vô định hình theo các phương pháp của sáng chế và tạo ra lượng lớn chế phẩm khô ổn định để bảo quản và sử dụng vật liệu hoạt tính sinh học nêu trên. (Xem Fig.7 và Fig.8 khi quan sát bằng mắt thường và kính hiển vi và hoạt độ nước (A_w) của chế phẩm khác nhau sau khi sấy khô). Hỗn hợp hydrat cacbon tạo ra độ ổn định cấu trúc cho chế phẩm ở nhiệt độ và độ ẩm cao như trên 30°C và $40\%\text{ RH}$. và/hoặc lợi ích của việc bảo vệ hóa học

và vật lý đối với vật liệu hoạt tính sinh học và ngăn chặn hoặc làm giảm các tác dụng bất lợi nhờ vào sự hoàn nguyên hoặc bù nước.

Phân đoạn polysacarit trong hỗn hợp hydrat cacbon có thể tạo ra độ sệt đặc cho chế phẩm và kiểm soát tốt hơn đối với các đặc tính về tỷ trọng của chế phẩm dưới chân không và độ bền cấu trúc tăng đối với các hợp phần chế phẩm được sấy khô theo sáng chế. (Xem Fig.8 - Các ảnh 4, 4b, 4c về cấu trúc thủy tinh và độ khô của chế phẩm cụ thể). Polysacarit thích hợp, cụ thể là sinh vật sống, là gồm hòa tan trong nước, do đặc tính đặc biệt của chúng để tạo ra gel sệt ở nhiệt độ vừa phải. Gôm ở nhiệt độ nhất định cũng được tìm thấy để ổn định hiệu quả cấu trúc chế phẩm dưới chân không, bằng cách tạo ra độ nhớt và tỷ trọng thích hợp cho chế phẩm và cho phép sấy khô hiệu quả chế phẩm trong bước loại bỏ nước sơ bộ ở độ nhớt cụ thể. Gôm đã biết cũng có thể tạo ra hydrogel bằng cách liên kết ngang với cation hóa trị hai hoặc đa hóa trị (ví dụ, alginat, pectin, chitosan) hoặc nhờ thay đổi nhiệt độ hoặc độ pH (ví dụ, gelatin, CMC, CAP, gôm gelan). Dung dịch được hydrogel hóa sẽ ngăn chặn các vấn đề có liên quan đến sự làm khô chân không dung dịch không đông lạnh. Gôm ở nồng độ nhất định cũng được tìm thấy để ổn định hiệu quả chế phẩm và hỗ trợ cho sự hình thành cấu trúc thủy tinh vô định hình và làm tăng dữ liệu sấy khô dưới chân không (xem Fig.7 - các ảnh 3a, 3b, 3c, 4, và các hình vẽ từ Fig.8 đến Fig.4c và Fig.13).

Đáng chú ý là khi xem các ảnh trên Fig.7 kết hợp với các kết quả được đưa ra dưới đây trong Bảng 1, hiển nhiên tất cả các mẫu 3b, 3c, 4, 5, và 6 đều được sấy khô đủ để tạo ra độ xốp trong cấu trúc thủy tinh vô định hình.

Bảng 1

		Kiểm tra bằng mắt các chế phẩm khô khác nhau							
		1	2	3a	3b	3c	4	5	6
	Độ khô	Không khô	Không khô	Không khô	Khô	Khô	Khô	Khô	Khô
	Độ xốp	Không	Không	Không	Có	Có	Có	Không	Một phần
	Aw	0,847	0,923	0,916	0,216	0,183	0,376	0,171	0,112
	Cấu trúc thủy tinh	Không	Không	Không	Một phần	Một phần	Có	Một phần	Một phần

Ví dụ, dạng khô của vật liệu hoạt tính sinh học có thể được bào chế thành dung dịch hoặc hỗn dịch chứa hỗn hợp bột chế phẩm. Hỗn hợp chế phẩm có thể được hòa tan vào dung dịch trong nước ấm nhờ khuấy trộn lực cắt thấp trước khi làm mát và trộn với vật liệu hoạt tính sinh học. Vật liệu hoạt tính sinh học, như virus hoặc vi khuẩn được nuôi cấy, có thể được cô và được tách khỏi môi trường nuôi cấy bằng cách ly tâm hoặc lọc trước khi tạo hỗn dịch lại thành chế phẩm. Mặt khác, toàn bộ hoặc một phần nước trong chế phẩm được tạo ra trong chất lỏng chứa vật liệu sinh học cô đặc. Hỗn dịch được duy trì ở nhiệt độ cao hơn không đáng kể so với nhiệt độ trong phòng và hỗn hợp bột chế phẩm khô được bổ sung từ từ vào hỗn dịch ấm (nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 40°C) chứa vật liệu sinh học. Hỗn dịch được khuấy nhẹ trong máy trộn kiểu hành tinh cho đến khi tất cả các thành phần được phân tán hoặc hòa tan hoàn toàn và thu được bùn sệt đồng nhất.

Tiếp đó có thể thu được hỗn hợp bùn sệt được liên kết ngang để tạo ra hydrogel (phụ thuộc vào các đặc tính polysaccharit) bằng cách bổ sung ion kim loại hoặc thay đổi nhiệt độ hoặc độ pH của bùn sệt và tiếp đó được sấy khô theo các phương pháp sấy khô của sáng chế. Theo cách khác, bùn sệt có thể được làm đông lạnh nhanh bằng cách phun qua vòi phun, chảy nhỏ giọt hoặc phun trong bồn chứa đá khô hoặc nitơ lỏng để tạo ra các phần tử nhỏ hoặc giọt nhỏ rắn, sợi hoặc hạt. Hạt rắn đông lạnh có thể được bảo quản trong máy làm lạnh sâu ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -30°C đến -80°C để sử dụng sau đó dưới dạng sản phẩm đông lạnh ổn định hoặc cho đến khi sấy khô. Phương pháp sấy khô được nêu làm ví dụ thích hợp là phương pháp sấy khô chân không trong đó nhiệt độ sản phẩm được duy trì cao hơn không đáng kể so với điểm kết đông. Giọt nhỏ hoặc hạt đông lạnh được đặt trên các khay có dung tích nạp nằm trong khoảng từ 0,1kg/sq ft đến khoảng 1,5kg/sq ft và được sấy khô theo phương pháp trong sáng chế. Theo một số phương án, quy trình sấy khô được khởi đầu bằng bước tẩy nhanh, cho phép sản phẩm thích nghi với nhiệt độ và cấu trúc ban đầu của các hạt đông lạnh để làm giảm bớt và làm ổn định và khí dư thừa được khử khí. Thông thường, bước tẩy diễn ra trong khoảng thời gian từ 1 đến 60

phút phụ thuộc vào độ nhớt của sản phẩm và tải trọng của khay. Hạt nhỏ hoặc các hạt nên giữ lại dưới dạng đông lạnh rắn trong toàn bộ bước tẩy. Nhiệt độ sản phẩm tiếp đó được đưa lên cao hơn điểm kết đông của nó và bước loại bỏ sơ bộ nước tiếp theo cho đến khi tất cả nước tự do được bay hơi khỏi sản phẩm. Khi nhiệt độ của chế phẩm đạt đến nhiệt độ mong muốn, thì nhiệt độ được điều chỉnh để duy trì nhiệt độ và bước sấy khô chất lỏng sơ bộ bằng cách tiến hành quy trình bay hơi. Ở bước này, chế phẩm đã được làm tan và sự bay hơi nước tăng nhanh diễn ra mà không cần đun sôi hoặc tạo bọt thêm. Quy trình sấy khô được hoàn thành bằng pha sấy thứ cấp bổ sung ở chân không tối đa và nhiệt độ tăng cao.

Phương pháp thông thường trong tình trạng kỹ thuật liên quan đến sự tạo bọt mạnh và/hoặc rơi lộp độp và sôi mãnh liệt có thể phá vỡ các chất sinh học nhạy và gây ra khó khăn cho quy mô công nghiệp ở dung tích nạp cao (xem ví dụ patent Mỹ số 6,534,087, trong đó áp suất chân không được áp dụng dẫn đến sôi mạnh và tạo bọt). Tuy nhiên, các chế phẩm và phương pháp hiện nay tránh được sự sôi hoặc tạo bọt của chế phẩm trong khi đạt được tốc độ sấy khô nhanh hơn đáng kể và cho phép dung tích nạp chế phẩm cao. Ngoài ra, sự khử khí hiệu quả và hoàn toàn của bùn sệt lỏng rất khó khăn và có thể cần đến khoảng thời gian kéo dài. Tất cả các trở ngại này được giải quyết trong sáng chế bằng cách sử dụng chế phẩm thích hợp cho phép sự loại bỏ sơ bộ nước hiệu quả trong khi cấu trúc thủy tinh được tạo ra mà không cần sôi và tạo bọt quá mức. Việc nạp các hạt đông lạnh rắn lên khay đối với bùn sệt hoặc xi-rô sệt có dung tích nạp lên khay trên mỗi diện tích sấy khô cao hơn nhiều so với dung tích được cung cấp theo các giải pháp đã biết.

Theo một ví dụ thích hợp của sáng chế, vật liệu sinh học là môi trường nuôi cấy vi khuẩn probiotic cô đặc sống. Hỗn hợp chế phẩm bột theo một số phương án chứa từ 1 đến 4% natri alginat hoặc gôm gelan, từ 50 đến 75% trehaloza, từ 1 đến 10% inulin hoặc FOS, từ 10 đến 20% chất thủy phân protein, như chất thủy phân casein, dịch sữa, đậu Hà lan, đậu tương hoặc hạt bông và từ

1 đến 10% natri xitrat hoặc natri ascorbat. Môi trường nuôi cấy probiotic có thể đã được sấy khô mới hoặc được làm đông lạnh dưới dạng bột khô.

Theo một ví dụ thích hợp khác của sáng chế, vật liệu sinh học là môi trường nuôi cấy vi sinh vật cô đặc sống. Hỗn hợp chế phẩm bột được điều chế bằng cách trộn từ 1 đến 4% natri alginat hoặc gôm gelan, từ 5 đến 30% trehaloza, từ 5 đến 40% inulin, từ 5 đến 40% maltodextrin DE thấp, từ 10 đến 30% protein thủy phân mạnh, như casein, dịch sữa, protein đậu Hà lan, đậu tương hoặc hạt bông. Chất tăng cường thủy tinh được bổ sung với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10% như natri xitrat, natri glutamat hoặc natri ascorbat cũng có thể chứa trong chế phẩm, như là một lựa chọn. Môi trường nuôi cấy vi sinh vật hoặc bào tử có thể đã được sấy khô mới hoặc được làm đông lạnh dưới dạng bột khô.

Hỗn hợp chế phẩm được bổ sung vào môi trường nuôi cấy probiotic cô đặc để đưa hàm lượng chất rắn của hỗn hợp dung dịch lên đến từ 40 đến 60% (trọng lượng/trọng lượng) và độ pH được điều chỉnh đến khoảng từ 6,5 đến 7,5 bằng ion phosphat hoặc xitrat. Dung dịch được trộn ở nhiệt độ cao hơn không đáng kể so với nhiệt độ trong phòng (thường nằm trong khoảng từ 25°C đến 37°C) cho đến khi tất cả các thành phần được hòa tan hoàn toàn. Hỗn hợp bùn sệt được chảy nhỏ giọt trong nitơ lỏng để tạo ra các giọt nhỏ hoặc hạt tiếp đó được loại bỏ khỏi nitơ lỏng, được đóng gói trong túi và được bảo quản trong máy làm lạnh sâu ở nhiệt độ -80°C cho đến khi sấy.

Phương pháp sấy khô vi khuẩn probiotic sống thông thường bao gồm bước dàn hạt đông lạnh rắn lên các khay theo lớp đồng nhất ở dung tích nạp nằm trong khoảng từ 100 đến 1500g/sq ft, và các khay được đặt ngay trong máy sấy đông lạnh. Chân không tiếp đó được đưa vào ở khoảng 1000mTORR (133,32 Pa) hoặc thấp hơn và phụ thuộc và kích cỡ máy sấy đông lạnh và loại nguồn nhiệt, nhiệt độ kế được điều chỉnh để duy trì các hạt nằm trong khoảng từ -20 đến khoảng -30°C. Hạt đông lạnh rắn được tẩy trong thời gian nằm trong khoảng từ 1 đến khoảng 60 phút và chân không được điều chỉnh đến khoảng từ 2000 đến 10000mTORR (từ 266,64 đến 1333,22 Pa) và sự truyền nhiệt tăng lên

để làm tăng nhiệt độ chế phẩm đến khoảng từ -20°C đến 0°C , hoặc từ khoảng -10°C đến 0°C , thường là khoảng -10°C . Điều kiện nhiệt độ và áp suất chân không này được duy trì trong bước loại bỏ sơ bộ nước có thể kéo dài từ một vài giờ đến nhiều hơn 24 giờ phụ thuộc vào tải trọng của khay. Tại một số thời điểm trong quy trình sấy sơ bộ, tốc độ bay hơi của dung môi chậm lại và nhiệt độ của chế phẩm bắt đầu tăng lên do sự cấp nhiệt dư trong buồng sấy. Điểm này chỉ ra sự kết thúc bước sấy sơ bộ theo sáng chế. Khi dung môi được đuổi ra khỏi chế phẩm, các hợp chất tạo hình thủy tinh trong dung dịch trở nên cô đặc và đậm đặc hơn cho đến khi nó ngừng chảy dưới dạng chất lỏng và tạo ra cấu trúc thủy tinh ổn định và/hoặc vô định hình.

Bước sấy thứ cấp tiếp theo ở chân không tối đa và nhiệt độ chế phẩm nằm trong khoảng từ 30°C đến 50°C . Mục đích của bước sấy thứ cấp là để loại bỏ hơi ẩm bị kẹt hoặc bị mắc còn lại và tạo ra chế phẩm ổn định khi bảo quản trong khoảng thời gian kéo dài ở nhiệt độ xung quanh. Bước sấy thứ cấp có thể kéo dài một vài giờ và điểm kết thúc của nó là khi chế phẩm khô hoàn toàn và hoạt độ nước của nó thấp hơn 0,3Aw.

Phương pháp sấy khô theo sáng chế làm cho vật liệu hoạt tính sinh học được bọc trong cấu trúc thủy tinh vô định hình, nhờ đó ngăn chặn sự không gấp nếp hoặc biến tính của protein và làm chậm lại đáng kể sự tương tác phân tử hoặc tính phản ứng ngang, do tính dễ biến đổi của hợp chất bị giảm nhanh và các phân tử khác trong hợp chất giống thủy tinh vô định hình. Với điều kiện là cấu trúc rắn vô định hình được giữ ở nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ chuyển tiếp thủy tinh của nó và hơi ẩm dư còn lại tương đối thấp, vi khuẩn probiotic có thể giữ lại tương đối ổn định, xem Fig.15. Nên lưu ý rằng việc đạt được cấu trúc thủy tinh không phải là điều kiện quyết định đối với độ ổn định trong thời gian dài khi một số vật liệu sinh học có thể hoạt động tốt hơn ở trạng thái tinh thể.

Cấu trúc thủy tinh đã sấy khô có thể được sử dụng toàn bộ, cắt thành các dạng và cỡ mong muốn, hoặc được nghiền và xay thành bột chảy tự do giúp dễ dàng xử lý xuôi dòng sau khi kết tụ, kết hạt, tạo viên nén, nén, ép viên ướt hoặc khô hoặc loại quy trình phân phối bất kỳ khác. Quy trình nghiền, xay, nghiền

vụn hoặc tán thành bột đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, máy nghiền kiểu búa, máy nghiền khí nén, máy nghiền đập, máy nghiền thủy lực, máy xay siêu mịn dạng búa, máy nghiền Wiley, hoặc thiết bị nghiền tương tự có thể được sử dụng. Cỡ hạt được nêu làm ví dụ thích hợp nhỏ hơn khoảng 1000 μ m và theo một số phương án nhỏ hơn 500 μ m.

Trong một ví dụ khác của sáng chế, bột ổn định khô chứa vật liệu hoạt tính sinh học được kết tụ bằng chất béo được nấu chảy. Bột khô được đặt trong máy trộn kiểu hành tinh ở nhiệt độ 40°C và chất béo được nấu chảy như bơ ca cao, sáp tự nhiên hoặc dầu được hydro hóa hoặc hỗn hợp của chúng được bổ sung từ từ vào bột ẩm khi trộn và hỗn hợp được làm lạnh xuống dưới nhiệt độ nóng chảy của chất béo trong khi trộn liên tục cho đến khi quan sát thấy đạt được kích cỡ của bột kết tụ đồng đều. Khối trọng lượng của hỗn hợp chất béo nấu chảy trong chế phẩm nằm trong khoảng từ 20% đến khoảng 70%, theo một số phương án nằm trong khoảng từ 30 đến 50%. Sản phẩm cuối cùng có thể được tiêu thụ dưới dạng được kết tụ hoặc được nén trong máy nén viên và được tiêu thụ dưới dạng viên nén.

Theo một ví dụ cụ thể, bột khô được nén trong máy nén viên để tạo ra viên nén có hình dạng và cỡ mong muốn. Chế phẩm sinh học khô và ổn định tùy ý được trộn với chất độn để điều chỉnh hiệu lực của viên nén đến liều dùng mong muốn. Chất độn có thể gồm, nhưng không giới hạn ở maltodextrin, natri carboxymetylxenluloza, canxi carboxy-metylxenluloza, silic dioxit keo, và kết hợp của chúng. Tùy ý, chất thúc đẩy sự phân hủy cũng chứa trong hỗn hợp tạo viên nén. Ví dụ về chất thúc đẩy sự phân hủy có thể gồm, nhưng không giới hạn ở natri croscarmeloza, crospovidon (polyvinylpyrrolidon không hòa tan), natri tinh bột glycolat, natri tinh bột glyconat, tinh bột được đông keo sơ bộ và hợp chất tương tự. Như được sử dụng ở đây, hỗn hợp viên nén có thể tùy ý chứa chất chảy. Chất chảy có thể gồm, nhưng không giới hạn ở magie stearat, canxi stearat, trạng thái kẽm, axit stearic và silic dioxit được hun khói như silic dioxit được hun khói kỵ nước hoặc ưa nước.

Phương pháp thích hợp để sản xuất các viên nén từ chế phẩm sinh học ổn định và các thành phần viên nén khác bao gồm phương pháp tạo viên nén chuẩn, bao gồm các phương pháp được sử dụng theo cách thông thường để sản xuất các viên nén nhiều lớp. Áp suất nén viên nén lên đến 50kN/cm^2 , tương ứng với độ bền kéo thấp hơn 100N (thiết bị Erweka) được ưu tiên, tuy nhiên sự phơi nhiễm nhiệt độ nên được giới hạn thấp hơn 60°C trong các trường hợp khác trong đó vật liệu sinh học là vi sinh vật sống.

Viên nén có thể được thiết kế để nuốt toàn bộ, nhai hoặc tiêu thụ dưới dạng viên nén sủi bọt. Khi các viên nén tan rã khi dùng, cho dù trong miệng, trong đồ uống hoặc trong dạ dày, thì vật liệu sinh học sẽ tiếp xúc với các vật liệu hoạt tính khác mà từ đó chúng được giữ riêng bởi cấu trúc viên nén. Việc này có khả năng gây hại cho vật liệu sinh học nếu nồng độ khu trú của vật liệu gây hại quá cao. Do đó, được ưu tiên theo một số phương án rằng sự phân hủy vật liệu hoạt tính sinh học bị trì hoãn để hàm lượng của các hoạt chất khác trong viên nén được pha loãng và được phân tán. Vấn đề này được giải quyết theo sáng chế bằng cách tạo ra chế phẩm có cấu trúc được liên kết ngang hoặc được hóa rắn như được mô tả ở đây. Theo một số phương án, vật liệu sinh học giữ lại nguyên vẹn trong nền chế phẩm nhờ vào việc trộn với nước. Theo một số phương án, vật liệu sinh học được giải phóng không làm tổn hại đến nền chế phẩm ở vị trí tác dụng mong muốn dọc theo đường tiêu hóa của động vật.

Viên nén theo sáng chế có thể được đóng gói theo cách này để bảo quản trạng thái khô ban đầu của chúng trong giới hạn cho phép. Việc này có thể liên quan đến sự bao gói các viên nén trong ngăn không thấm hơi ẩm như ống hoặc bao bì xốp hoặc bình chứa chứa chất làm khô như silicagel để hấp phụ nước để làm giảm hoạt độ nước trong bình chứa. Để bảo vệ khỏi oxy, gói như vậy cũng có thể chứa vật liệu thu hồi oxy như FreshPax®, Ageless™, ascorbyl palmitat hoặc ascorbat khác, propyl galat hoặc galat khác, alpha-tocopherol, magie hoặc natri sulfit, hydroxylanisol được butyl hóa hoặc hydroxytoluen được butyl hóa và hợp chất tương tự.

Chế phẩm và phương pháp được mô tả ở đây làm ổn định vật liệu sinh học và bảo quản hoạt tính của nó trong thời gian bảo quản kéo dài ở nhiệt độ xung quanh và độ ẩm tương đối cao hơn. Ví dụ, chế phẩm được thử nghiệm độ ổn định bằng cách đưa chúng vào ở nhiệt độ tăng cao (ví dụ, 40°C) và độ ẩm cao (ví dụ, 33% RH, hoặc 43% RH) và đo hoạt tính sinh học của chế phẩm. Là một ví dụ cho vi khuẩn probiotic sống, kết quả của các nghiên cứu này chứng minh rằng vi khuẩn được tạo ra trong chế phẩm này ổn định trong thời gian ít nhất 60 ngày. Độ ổn định được xác định ở thời gian giảm hiệu lực một log CFU/g. Chế phẩm như vậy có thể ổn định ngay khi nồng độ cao của vật liệu hoạt tính sinh học được sử dụng. Do đó, các chế phẩm này có ưu điểm ở chỗ chúng có thể được vận chuyển và bảo quản ở nhiệt độ bằng hoặc cao hơn nhiệt độ trong phòng trong khoảng thời gian dài.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Điều chế chế phẩm ổn định và khô

Hỗn hợp hydrat cacbon bazơ

Khoảng 70g trehaloza (Cargill Minneapolis, MN), khoảng 5g inulin dùng ngay được (Cargill Minneapolis, MN) và khoảng 3g natri alginat (ISP Corp., Wayne, NJ) được trộn đồng nhất dưới dạng khô.

Hỗn hợp chất tăng cường thủy tinh bazơ

Khoảng 17g chất thủy phân casein hoặc chất thủy phân đậu Hà lan (chất thủy phân được siêu lọc, Marcor, Carlstadt, NJ) và 5g natri xitrat hoặc natri ascorbat (Sigma, St. Louis, MO) được trộn đồng đều dưới dạng khô.

Độ ổn định của vi khuẩn probiotic

Nồng độ mới của *Lactobacillus rhamnosus*. (100ml ở 10% chất rắn, thu trực tiếp từ quy trình lên men) được bổ sung vào máy pha trộn và được giữ ở nhiệt độ 35°C. Khoảng 78g hỗn hợp hydrat cacbon bazơ và khoảng 22g hỗn hợp chất tăng cường thủy tinh bazơ được bổ sung từ từ vào môi trường nuôi cấy probiotic và việc trộn được tiến hành ở nhiệt độ 35°C trong thời gian 10 phút.

Hỗn hợp bùn sệt tiếp đó được chuyển vào bình có đáy đục lỗ và để chảy nhỏ giọt vào bồn chứa nitơ lỏng. Hạt tiếp đó được loại bỏ khỏi nitơ lỏng và được chuyển ngay sang bước sấy khô.

Sấy khô các hạt đông lạnh chứa vi khuẩn probiotic

Hạt đông lạnh được dàn rộng trên khay có dung tích nạp bằng 200g/sq ft và được đặt ngay trên kệ trong máy sấy đông lạnh (Model 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY).

Tiếp đó chân không được điều chỉnh đến khoảng từ 2000 đến 2700mTORR (từ 266,64 đến 359,97 Pa) và nhiệt độ kệ tăng lên đến nhiệt độ +30°C. Việc điều chỉnh nhiệt độ và áp suất chân không này được duy trì trong thời gian 5 giờ. Tùy ý, nhiệt độ của các hạt đông lạnh được làm thích nghi ở nhiệt độ khoảng -20°C trước khi khởi động bước sấy khô chất lỏng sơ bộ bằng cách đưa áp suất chân không ở khoảng 1000mTORR (133,32 Pa) và cho phép các hạt được làm đông lạnh rắn làm sạch trong thời gian khoảng 10 phút. Bước làm khô sơ bộ tiếp theo bằng cách điều chỉnh áp suất chân không nằm trong khoảng từ 2000 đến 2700mTORR (từ 266,64 đến 359,97 Pa) và nhiệt độ kệ tăng lên đến +30°C. Việc điều chỉnh nhiệt độ và áp suất chân không này được duy trì trong thời gian khoảng 5 giờ. Bước sấy thứ cấp tiếp theo ở chân không đủ (từ 150 đến 200mTORR (từ 20 đến 26,66 Pa)) và nhiệt độ kệ được giữ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 50°C trong thời gian 3 giờ nữa. Chế phẩm được sấy khô hoàn toàn và hoạt độ nước của nó được đo bằng thiết bị Hygropalm Awl (Rotonic Instrument Corp., Huntington, NY.) ở $A_w = 0,23$.

Ví dụ 2

Độ ổn định bảo quản của vi khuẩn probiotic khô

Fig.1 thể hiện độ ổn định bảo quản dưới hai điều kiện bảo quản nhanh khác nhau ở nhiệt độ 40°C và 33%RH và nhiệt độ 30°C và 43%RH của vi khuẩn probiotic ổn định khô từ Ví dụ 1 và vi khuẩn probiotic khô có bán trên thị trường (Culturelle, Amerifit, Inc., Cromwell, CT). Vi khuẩn probiotic thương mại mất khả năng sống của nó trong một vài tuần đầu tiên dưới điều kiện bảo quản nhanh, trong khi chế phẩm khô của vi khuẩn probiotic theo sáng chế chỉ

mất 1,18 log sau thời gian 60 ngày ở nhiệt độ 30°C và 43%RH và chỉ 1,09 log ở nhiệt độ 40°C và 33%RH.

Ví dụ 3

Sản xuất trên quy mô lớn chế phẩm khô ổn định chứa vi khuẩn probiotic *Lactobacillus rhamnosus*

Lactobacillus rhamnosus (400g nồng độ đông lạnh từ nguồn thương mại) được làm tan ở nhiệt độ 37°C trong máy trộn kiểu hành tinh kép được bọc (DPM, lqt, Ross Engineering, Inc. Savannah, GA,) và hàm lượng chất rắn được điều chỉnh đến 10% trọng lượng chất rắn với nước chung cất). Khoảng 212g trehaloza (Cargill Minneapolis, MN), khoảng 20g Inulin dùng ngay được (Cargill Minneapolis, MN), khoảng 12g natri alginat (ISP Corp., Wayne, NJ), khoảng 136g chất thủy phân casein (chất thủy phân siêu lọc, Marcor, Carlstadt, NJ) và khoảng 20g natri ascorbat (Sigma, St. Louis, MO) được trộn đồng đều dưới dạng khô. Hỗn hợp bột được bổ sung từ từ vào môi trường nuôi cấy probiotic và việc trộn được thực hiện ở 40 vòng/phút và nhiệt độ 37°C trong thời gian 10 phút. Tiếp đó bùn sệt được chuyển vào bình có đáy được đục lỗ và để giọt vào bồn chứa nitơ lỏng. Hạt tiếp đó được loại bỏ khỏi nitơ lỏng, được đặt trong túi lá nhôm được bịt kín và được bảo quản trong máy làm lạnh sâu ở nhiệt độ -80°C trong thời gian một vài tuần.

Để sấy khô, hạt đông lạnh được dàn đều lên các khay với dung tích nạp nằm trong khoảng từ 500 lên đến 1500g/sq ft và các khay được đặt trên các kệ trong máy sấy đông lạnh (Model 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). Bước sấy khô chất lỏng sơ bộ được khởi động bằng cách điều chỉnh áp suất chân không đến khoảng từ 2000 đến 2700mTORR (từ 266,64 đến 359,97 Pa) và nhiệt độ sản phẩm tăng lên và được ổn định trong khoảng từ -10 đến -5°C. Theo thời gian (từ khoảng 10 đến 16 giờ), nhiệt độ sản phẩm tăng lên đến khoảng từ 20 đến 25°C tại điểm đó bước sấy thứ cấp được khởi động ở chân không tối đa (từ 150 đến 200mTORR (từ 20 đến 26,66 Pa)) và nhiệt độ sản phẩm được giữ ở khoảng từ 30 đến 40°C trong thời gian 14 giờ nữa. Chế phẩm được sấy khô hoàn toàn và hoạt độ nước của nó được đo ở 0,23Aw.

Ví dụ 4

Việc sản xuất quy mô lớn chế phẩm khô ổn định chứa vi khuẩn probiotic *Bifidobacterium lactis*.

Bifidobacterium lactis (400g nồng độ đông lạnh từ nguồn thương mại) được làm tan ở nhiệt độ 37°C trong máy trộn kiểu hành tinh kiểu kép được bọc (DPM, lqt, Ross Engineering, Inc. Savannah, GA.). Khoảng 212g trehaloza (Cargill Minneapolis, MN), khoảng 20g Inulin dùng ngay được (Cargill Minneapolis, MN), khoảng 12g natri alginat (ISP Corp., Wayne, NJ) và khoảng 20g natri ascorbat (Sigma, St. Louis, MO) được trộn đồng nhất dưới dạng khô. Hỗn hợp bột được bổ sung từ từ vào môi trường nuôi cấy probiotic. Khoảng 136g chất thủy phân đậu Hà lan (chất thủy phân được siêu lọc, Marcor, Carlstadt, NJ) được hòa tan trong 80g nước chưng cất và hỗn hợp được gia nhiệt hoặc làm ấm trong thời gian ngắn trong bồn nước đến nhiệt độ 60°C cho đến khi hòa tan hoàn toàn và tiếp đó được làm mát xuống đến nhiệt độ khoảng 35°C. Bột trộn khô và dung dịch chứa chất thủy phân protein đậu Hà lan được bổ sung vào dung dịch cô đặc probiotic và việc trộn được tiến hành ở 40 vòng/phút và nhiệt độ 37°C trong thời gian 20 phút. Tiếp đó bùn sệt được chuyển vào lọ nhỏ có đáy được đục lỗ và để chảy nhỏ giọt vào bồn chứa nito lỏng. Hạt tiếp đó được loại bỏ khỏi nito lỏng, được đặt trong túi lá nhôm được bịt kín và được bảo quản trong máy làm lạnh sâu ở nhiệt độ -80°C trong thời gian một vài tuần.

Để sấy khô, hạt đông lạnh thậm trí được dàn đều lên các khay có dung tích nạp bằng 800g/sq ft và các khay được đặt trên các kệ trong máy sấy đông lạnh (Model 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). Bước sấy khô lỏng sơ bộ được khởi động bằng cách điều chỉnh áp suất chân không đến khoảng từ 2000 đến 2700mTORR (từ 266,64 đến 359,97 Pa) và nhiệt độ sản phẩm tăng lên và được ổn định trong khoảng từ -10 đến -5°C. Theo thời gian (khoảng từ 10 đến 16 giờ), nhiệt độ sản phẩm tăng lên đến khoảng từ 20 đến 25°C tại thời điểm bước sấy thứ cấp được khởi đầu ở chân không tối đa (từ 150 đến 200mTORR (từ 20 đến 26,66 Pa)) và nhiệt độ sản phẩm được giữ ở khoảng từ 30 đến 40°C trong

thời gian 14 giờ nữa. Chế phẩm được sấy khô hoàn toàn và hoạt độ nước của nó được đo ở 0,23Aw.

Ví dụ 5

Điều chế chế phẩm hydrogel chứa vi khuẩn probiotic *Bifidobacterium lactis*

Bùn sệt probiotic cô đặc chứa *Bifidobacterium lactis* được điều chế theo Ví dụ 1. 0,5g canxi phosphat dibazơ được bổ sung vào chế phẩm bazơ, tiếp theo bổ sung 0,5g gluconolacton vào. Bùn sệt được làm rắn ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ tiếp theo để tạo ra hydrogel rắn. Gel rắn được cắt thành sợi mỏng và dài, bằng cách sử dụng máy cắt mỏng/thiết bị cắt vụn có bán trên thị trường. Sợi mỏng được nạp trực tiếp lên các khay có dạng âm hoặc được làm đông lạnh nhanh trong nitơ lỏng và được nạp lên khay có dung tích nạp bằng 500g/sq ft và được đặt trong máy sấy đông lạnh để sấy khô như được mô tả trong Ví dụ 3. Hoạt độ nước (Aw) của chế phẩm là 0,05 (được đo bởi HygroPalm Aw1, Rotronic Huntington, NY). Chế phẩm khô còn được nghiền thành bột mịn bằng cách sử dụng thiết bị nghiền kiểu búa chuẩn và được sàng qua các sàng có cỡ từ 50 đến 250micron.

Ví dụ 6

Tối ưu hóa tỷ lệ mol giữa chất tăng cường thủy tinh và hỗn hợp hydrat cacbon.

Các chế phẩm khác nhau chứa tỷ lệ mol của chất tăng cường thủy tinh và hỗn hợp hydrat cacbon khác nhau được điều chế theo Ví dụ 1. Môi trường nuôi cấy đặc của vi khuẩn probiotic *L. paracasei* thu được từ nguồn thương mại và được điều chế trong chế phẩm khô như được mô tả trong Ví dụ 1 ngoại trừ bùn sệt được nạp trực tiếp lên các khay ở dạng ướt mà không cần các bước làm đông lạnh nhanh và bước tẩy. Bùn sệt được sấy khô trong giai đoạn sơ cấp và thứ cấp như được mô tả trong các Ví dụ 1 và 3 ngoại trừ nhiệt độ kệ tăng lên đến 40°C trong các giai đoạn sấy sơ bộ và thứ cấp. Bột ổn định phụ thuộc vào các điều kiện bảo quản nhanh ở nhiệt độ 37°C và 33%RH trong thời gian 84 ngày. Fig.2 thể hiện ảnh hưởng của tỷ lệ mol khác nhau đối với độ ổn định của vi khuẩn được sấy khô. Các kết quả chỉ ra rằng tỷ lệ giữa chất tăng cường thủy tinh và hỗn hợp hydrat cacbon nằm trong khoảng từ 0,12 đến 0,15.

Ví dụ 7

Hiệu quả của chế phẩm theo sáng chế đối với độ ổn định bảo quản của vi khuẩn probiotic *L. acidophilus*.

Chế phẩm chứa hỗn hợp hydrat cacbon và hỗn hợp chất tăng cường thủy tinh như được mô tả trong Ví dụ 1 được điều chế. Môi trường nuôi cấy đặc của vi khuẩn probiotic *L. acidophilus* thu được từ nguồn thương mại và được điều chế trong chế phẩm khô như được mô tả trong các Ví dụ 1 và 3 và bột ổn định phụ thuộc vào điều kiện bảo quản nhanh ở nhiệt độ 24°C và 33%RH trong thời gian 537 ngày. Fig.3 chứng minh độ ổn định cao của probiotic được bào chế bằng chế phẩm theo sáng chế. Các kết quả thể hiện khả năng sống của probiotic chỉ bị giảm khoảng 0,18 log trong thời gian 537 ngày bảo quản trên kệ trong các điều kiện quy định.

Ví dụ 8

Hiệu quả của hợp chất tăng cường thủy tinh khác nhau đối với độ ổn định bảo quản của vi khuẩn probiotic *L. acidophilus*

Chế phẩm khác nhau chứa hỗn hợp hydrat cacbon như được mô tả trong Ví dụ 1 và hỗn hợp chất tăng cường thủy tinh chứa chất thủy phân casein và natri xitrat hoặc natri ascorbat hoặc hỗn hợp của hai hợp chất này được điều chế. Môi trường nuôi cấy đặc của vi khuẩn probiotic *L. acidophilus* thu được từ nguồn thương mại và được điều chế trong chế phẩm khô như được mô tả trong Ví dụ 1 ngoại trừ bùn sệt được nạp trực tiếp lên các khay dưới dạng ướm mà không cần bước đông lạnh nhanh và bước tẩy. Bùn sệt được làm khô trong giai đoạn thứ nhất và thứ hai như được mô tả trong các ví dụ 1 và 3 và bột ổn định phụ thuộc vào điều kiện bảo quản nhanh ở nhiệt độ 24°C và 43%RH trong thời gian 180 ngày. Fig.4 thể hiện ảnh hưởng của các hợp chất tăng cường thủy tinh khác nhau đối với độ ổn định của vi khuẩn được sấy khô. Các kết quả đề xuất độ ổn định tốt hơn đáng kể thu được bao gồm cả chất tăng cường thủy tinh bổ sung trên đỉnh của chất thủy phân protein. Cụ thể là, gồm cả lượng cân bằng của natri axetat và natri ascorbat cũng tạo ra chế phẩm ổn định nhất. Kết quả từ cả Ví dụ 5 và 6 cũng đề xuất rằng các chất tăng cường thủy tinh khác nhau có thể

có hiệu quả hơn hoặc thậm chí có thể đóng vai trò làm chất làm mất ổn định phụ thuộc vào chủng vi khuẩn.

Ví dụ 9

Hiệu quả của tỷ lệ của chất thủy phân protein/đường khác nhau đối với độ ổn định bảo quản của vi khuẩn probiotic *Bifidobacterium lactis*

Một vài chế phẩm chứa hỗn hợp hydrat cacbon và chất tăng cường thủy tinh như được mô tả trong Ví dụ 1 và chế phẩm chứa lượng cân bằng nhưng ở tỷ lệ khác nhau của chất thủy phân đậu Hà lan/trehaloza khi có hoặc không có natri ascorbat được điều chế. Môi trường nuôi cấy đặc của vi khuẩn probiotic *Bifidobacterium lactis* thu được từ nguồn thương mại và được điều chế trong chế phẩm khô như được mô tả trong các Ví dụ 1 và 3 và bột ổn định phụ thuộc vào điều kiện bảo quản nhanh ở nhiệt độ 35°C và 43%RH trong thời gian 7 tuần. Fig.5 thể hiện hiệu quả của tỷ lệ 1:4, 1:2,5 và 1:1,5 của chất thủy phân đậu Hà lan/trehaloza có hoặc không có natri ascorbat đối với độ ổn định của vi khuẩn được sấy khô. Các kết quả đề xuất rằng độ ổn định tốt hơn đáng kể thu được ở tỷ lệ cao của chất thủy phân đậu Hà lan/trehaloza. Cụ thể là, tỷ lệ của 1:1,5 chất thủy phân đậu Hà lan/trehaloza tạo ra chế phẩm ổn định hơn. Việc bao gồm natri ascorbat ở tỷ lệ chất thủy phân đậu Hà lan/trehaloza cao hơn dẫn đến độ ổn định cao hơn so với các chế phẩm được loại natri ascorbat.

Ví dụ 10

Tối ưu độ pH để ổn định tối đa probiotic *L. rhamnosus*

Một số chế phẩm chứa hỗn hợp hydrat cacbon và chất tăng cường thủy tinh như được mô tả trong Ví dụ 1 ở độ pH khác nhau được điều chế. Môi trường nuôi cấy đặc của vi khuẩn probiotic *L. rhamnosus* thu được từ nguồn thương mại và được điều chế trong chế phẩm khô như được mô tả trong các Ví dụ 1 và 3. Bột ổn định phụ thuộc vào điều kiện bảo quản nhanh ở nhiệt độ 40°C và 33%RH trong thời gian 8 tuần. Fig.6 thể hiện tác dụng pH của bunsen đối với độ ổn định của vi khuẩn được sấy khô. Các kết quả chứng minh rằng độ ổn định tối ưu đạt được ở pH trung tính (~7).

Ví dụ 11

Bột khô ổn định chứa enzym

Công thức hydrogel chứa 40 phần trăm trọng lượng của phitaza (BASF, GmBH) được điều chế bằng cách trộn 400g hỗn hợp hydrat cacbon và 200g hỗn hợp chất tăng cường thủy tinh như được mô tả trong các Ví dụ 1 và 4 và 400g phitaza trong 1000ml nước. Chế phẩm hydrogel được cắt thành miếng nhỏ được đông lạnh nhanh trong nitơ lỏng và được sấy khô trong lò chân không ở nhiệt độ sấy sơ bộ và thứ cấp bằng 50°C. Để xác định tải trọng và độ ổn định bảo quản của chế phẩm được sấy khô: mẫu khô được cân chính xác (<100mg) trong ống ly tâm. Phân đoạn 200µl của dimetyl sulfoxit (DMSO) được bổ sung vào. Chế phẩm được hòa tan trong dung dịch đậm DMSO bằng cách lắc mạnh. 0,8ml dung dịch chứa 0,05N NaOH, 0,5% SDS và 0,075M axit xitric (muối trinitrat) được bổ sung vào mẫu này. Các ống được hòa tan bằng sóng siêu âm trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ 45°C, sau đó bằng cách ly tâm nhanh ở 5000 vòng/phút trong thời gian 10 phút. Phần phân ước của dung dịch DMSO/NaOH/SDS/xitrat trong được đưa vào các lỗ của khay vi thể và được phân tích hàm lượng protein bằng cách sử dụng phương pháp phân tích Bradford. Độ ổn định của chế phẩm khô enzym ổn định sau khi phơi nhiễm với nhiệt độ 95°C trong thời gian 20 phút cao hơn đáng kể so với enzym khô không có chế phẩm theo sáng chế.

Ví dụ 12

Bột khô ổn định chứa vacxin virut bệnh thiếu máu ở cá hồi bị lây nhiễm (infectious salmon anemia virus - ISAV).

Bùn sệt đặc của vacxin ISAV (Novozyme, Denmark) được điều chế theo Ví dụ 4 ngoại trừ 20ml dung dịch chitosan 4% trong axit axetic 0,5% được bổ sung vào bùn sệt chứa dung dịch đậm đặc của vacxin ISAV, hỗn hợp hydrat cacbon và chất tăng cường thủy tinh. 0,5g canxi phosphat dibazơ được bổ sung vào, sau đó bổ sung vào 0,5g gluconolacton. Bùn sệt được làm hóa rắn ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ tiếp theo để tạo ra hydrogel rắn. Gel rắn được cắt từng miếng mỏng thành sợi mỏng và dài, bằng cách sử dụng máy cắt mỏng/thiết bị cắt vụn có bán trên thị trường. Sợi mỏng được nạp trực tiếp lên các khay ở dạng ướt hoặc được làm đông lạnh nhanh trong nitơ lỏng và được

đưa lên khay ở dung tích nạp bằng 1500g/sq ft và được đặt trong máy sấy đông lạnh để làm khô như được mô tả trong Ví dụ 3. Hoạt động nước (A_w) của chế phẩm bằng 0,25. Chế phẩm khô được nghiền thêm thành bột mịn bằng cách sử dụng thiết bị nghiền kiểu búa tiêu chuẩn và được sàng qua sàng cỡ từ 50 đến 150micron. Chế phẩm ISAV khô ổn định được sử dụng để chủng ngừa qua đường miệng bằng lớp bọc trên cùng của vật liệu cấp thương mại với chế phẩm khô và cung cấp cho cá hồi Atlantic.

Ví dụ 13

Điều chế môi loại xâm chiếm

Môi được vê tròn cho loài xâm chiếm đích cụ thể theo sáng chế được điều chế chứa chất diệt sinh vật gây hại. 200g chế phẩm được mô tả trong Ví dụ 9 được điều chế và bổ sung vào 200gm nước. 90gm Rotenon và 0,5gm canxi phosphat dibazơ được bổ sung vào dung dịch này, sau đó bổ sung vào 0,5gm gluconolacton. Bùn sệt được sấy phun trực tiếp trong máy sấy phun công nghiệp tiêu chuẩn, và chế phẩm khô được sử dụng cho loài xâm chiếm đặc hiệu đích mà không có tác dụng có hại của độc tố đối với môi trường hoặc hệ sinh thái trong phạm vi gần.

Ví dụ 14

Điều chế chế phẩm probiotic thực vật được bảo vệ

Tác nhân kiểm soát sinh học như *Rhizobacteria* được điều chế trong chế phẩm khô theo Ví dụ 4. Hiệu lực của chế phẩm *Rhizobacteria* khô được đánh giá đối với sự sinh trưởng của rau diếp dưới điều kiện thí nghiệm đã biết. Liều dùng 100mg của chế phẩm khô *Rhizobacteria* trên mỗi cây được cấy vào lọ có cát và được trồng các cây con rau diếp nảy mầm trước (24 giờ). Liều dùng chất dinh dưỡng trong 5ml dung dịch Hoagland vô trùng được phun vào cây trong bình. Bình được sắp xếp ngẫu nhiên trong buồng sinh trưởng được duy trì ở nhiệt độ 28°C với chu kỳ sáng 12 giờ. Trong thời gian 7 ngày sau khi cấy, cây và cát dính được loại bỏ cẩn thận khỏi bình. Rễ được rửa trong dung dịch đệm phosphat vô trùng (pH=7,0), và số đo chiều dài rễ được ghi lại.

Ví dụ 15

Điều chế cơ chất probiotic khô và ổn định

Chế phẩm bazơ

Phần 75g trehaloza (Cargill Minneapolis, MN) và 22g casein thủy phân mạnh (Marcor, Carlstadt, NJ) được trộn đều với 3g natri alginat (ISP Corp., Wayne, NJ) dưới dạng khô. Dung dịch cô đặc mới chứa *Lactobacillus acidophilus* (100ml chứa ít nhất 10% chất rắn, thu trực tiếp từ quy trình lên men) được bổ sung trong hỗn hợp pha trộn và được giữ ở nhiệt độ 35°C. Hỗn hợp khô chứa gồm, đường và protein thủy phân được bổ sung từ từ vào môi trường nuôi cấy probiotic và bước trộn được thực hiện ở nhiệt độ 35°C trong thời gian 10 phút. Hỗn hợp bùn sệt tiếp đó được chuyển vào bình có đáy được đục lỗ và để nhỏ giọt vào bồn chứa nitơ. Tiếp đó các hạt được loại bỏ nitơ lỏng và được chuyển ngay sang bước sấy khô.

Sấy khô hạt được đông khô chứa chế phẩm bazơ

Hạt đông lạnh được dàn đều lên khay ở dung tích nạp bằng 100g/sq ft và được đặt trực tiếp lên kệ trong máy sấy đông lạnh (Model 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). Áp suất chân không tiếp đó được đặt ở 1000mTORR (133,32 Pa) và hạt đông lạnh rắn được làm sạch trong thời gian 10 phút. Tiếp đó chân không được điều chỉnh đến 2700mTORR (359,97 Pa) và nhiệt độ kệ được tăng lên đến +30°C. Nhiệt độ và áp suất chân không này được giữ ở trong thời gian 3 giờ. Bước sấy thứ cấp tiếp đó ở bước chân không đủ (từ 150 đến 200mTORR (từ 20 đến 26,66 Pa)) và nhiệt độ kệ được tăng lên đến 30°C trong thời gian 2 giờ nữa. Chế phẩm được sấy khô hoàn toàn và hoạt độ nước của nó được đo bằng thiết bị Hygropalm Awl (Rotonic Instrument Corp., Huntington, NY.) ở $A_w = 0,23$.

Ví dụ 16

Chế phẩm khô ổn định chứa vi khuẩn probiotic *Lactobacillus rhamnosus* LGG

Lactobacillus rhamnosus LGG (500g dung dịch cô đặc đông lạnh từ nguồn thương mại) được làm tan ở nhiệt độ 37°C trong máy trộn kiểu hành tinh kép được bọc (DPM, lqt, Ross Engineering, Inc. Savannah, GA.). Hai chất tạo hình thủy tinh; trehaloza (387g, Cargill Minneapolis, MN) và casein thủy phân mạnh

(83g, Marcor, Carlstadt, NJ) được trộn đồng nhất dưới dạng khô với hai chất tạo ra chất nền; natri alginat (15g, ISP Corp., Wayne, NJ) và Inulin dùng ngay được (25g, Cargill Minneapolis, MN). Hỗn hợp khô được bổ sung từ từ vào vi khuẩn probiotic được làm tan và việc trộn được tiến hành ở 40 vòng/phút và nhiệt độ 37°C trong thời gian 10 phút. Độ nhớt của bùn sệt được điều chỉnh đến 12000Cp bằng cách bổ sung từ 50 đến 200ml nước. Bùn sệt tiếp đó được chuyển vào bình có đáy được đục lỗ và được để chảy nhỏ giọt vào bình chứa nitơ lỏng. Hạt tiếp đó được loại bỏ khỏi nitơ lỏng, được đặt trong túi lá nhôm được bịt kín và được bảo quản trong máy làm lạnh sâu ở nhiệt độ -80°C trong thời gian một vài tuần.

Để sấy khô, các hạt đông lạnh được dàn đều lên khay ở dung tích nạp nằm trong khoảng từ 100 đến 500g/sq ft và các khay được đặt trên các kệ trong máy sấy đông lạnh (Model 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). Áp suất chân không được đặt ở 1000mTorr (133,32 Pa) và nhiệt độ kệ được điều chỉnh đến nhiệt độ +20°C. Hạt đông lạnh rắn được làm sạch trong thời gian nằm trong khoảng từ 1 đến 30 phút. Bước tẩy tiếp theo bước sấy sơ bộ sau khi điều chỉnh áp suất chân không đến 2700mTORR (266,64 Pa) và nhiệt độ kệ được tăng lên đến +30°C. Nhiệt độ và áp suất chân không này được giữ trong thời gian 12 giờ. Bước sấy thứ cấp tiếp đó ở chân không đủ (từ 150 đến 200mTORR (từ 20 đến 26,66 Pa)) và nhiệt độ kệ được giữ ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 4 giờ. Chế phẩm được sấy khô hoàn toàn và hoạt độ nước của nó được đo ở 0,23Aw. Fig.13 thể hiện dữ liệu sấy khô của chế phẩm probiotic.

Khả năng sống mất đi sau khi làm đông lạnh bùn sệt ở nhiệt độ khác nhau (+4°C, -80°C và -180°C) và sau khi quy trình sấy khô bao gồm chế phẩm chứa hạt được đông khô, và bước sấy khô trong máy sấy đông lạnh được thể hiện trên các hình vẽ Fig.10, Fig.11 và Fig.14. Khả năng sống mất đi trong toàn bộ quy trình thường <1 log phụ thuộc vào loại môi trường nuôi cấy vi khuẩn (môi trường nuôi cấy được làm lạnh hoặc khô) và trên điểm kết đông của hỗn hợp bùn sệt. Các kết quả cho thấy rằng việc làm đông lạnh nhanh vi khuẩn probiotic

trong nitơ lỏng (-180°C) là quy trình phá hủy ít hơn so với quy trình đông lạnh ở nhiệt độ -80°C .

Các hình vẽ Fig.12 & Fig.15 thể hiện ảnh hưởng của khoảng thời gian tẩy khác nhau nằm trong khoảng từ 0 phút (không tẩy) đến 30 phút đối với số vi khuẩn probiotic đếm được ban đầu trong chế phẩm khô và đối với độ ổn định bảo quản dưới điều kiện bảo quản nhanh ở nhiệt độ 40°C và 33%RH. Các kết quả đề xuất rằng thời gian làm sạch lâu hơn thường cải thiện số vi khuẩn đếm được ban đầu trong chế phẩm khô nhưng không có tác dụng đối với độ ổn định bảo quản của chế phẩm probiotic.

Ví dụ 17

Trehaloza (752g, Cargill Minneapolis, MN), protein đậu Hà lan thủy phân mạnh (167g, Marcor, Carlstadt, NJ), natri alginat (30g, ISP Corp., Wayne, NJ) và Inulin dùng ngay được 50g, Cargill Minneapolis, MN) được phối trộn đồng nhất dưới dạng khô. Hỗn hợp khô được bổ sung từ từ vào 1000ml nước khử ion nóng ở nhiệt độ 80°C trong máy trộn kiểu hành tinh kép được bọc (DPM, lqt, Ross Engineering, Inc. Savannah, GA,) và việc trộn được tiến hành ở 40 vòng/phút trong thời gian 10 phút. Nhiệt độ của hỗn hợp bị giảm đến 37°C và 100g bột khô chứa *Lactobacillus rhamnosus* LGG thu được từ nguồn thương mại được bổ sung từ từ và được trộn liên tục trong thời gian 20 phút. Bùn sệt tiếp đó được ép đùn qua kim lỗ 2mm vào bồn chứa nitơ lỏng. Sợi/hạt tiếp đó được loại bỏ khỏi nitơ lỏng được đặt trong túi lá nhôm được bịt kín và được bảo quản trong máy làm lạnh sâu ở nhiệt độ -80°C trong thời gian một vài tuần. Để sấy khô, sợi/hạt được làm lạnh được dàn đều trên các khay ở dung tích nạp nằm trong khoảng từ 100 đến 500g/sq ft và các khay được đặt trên các kệ trong máy sấy đông lạnh (Model 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY) và được sấy khô như được mô tả trong Ví dụ 16. Tất cả chế phẩm được giữ thích hợp trong khay và không kêu lộp độp hoặc tạo bọt được quan sát trong tất cả các mức nạp. Chế phẩm được sấy khô hoàn toàn ngay cả ở dung tích nạp cao hơn và hoạt độ nước được đo ở 0,26Aw và thấp hơn đối với tất cả các mẫu.

Ví dụ 18

Điều chế chế phẩm hydrogel chứa vi khuẩn probiotic *Bifidobacterium sp.*

Bùn sệt probiotic đặc chứa *Bifidobacterium sp.* được điều chế theo Ví dụ 15. 0,5g canxi phosphat dibazơ được bổ sung vào chế phẩm bazơ, tiếp đó bổ sung 0,5g gluconolacton vào. Bùn sệt được hóa rắn ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ tiếp theo để tạo ra hydrogel rắn. Gel chắc được cắt ra thành sợi mỏng và dài, bằng cách sử dụng máy cắt mỏng/thiết bị cắt vụn có bán trên thị trường. Sợi mỏng được làm đông lạnh nhanh trong nitơ lỏng và được nạp trên khay ở dung tích nạp bằng 700g/sq ft và được đặt trong máy sấy đông lạnh để sấy khô như được mô tả trong Ví dụ 16. Hoạt độ nước (A_w) của chế phẩm bằng 0,05 (Measured by HygroPalm Aw1, Rotronic Huntington, NY). Chế phẩm khô được nghiền thêm thành bột mịn sử dụng thiết bị nghiền kiểu búa tiêu chuẩn và được sàng qua các sàng có cỡ từ 50 đến 250micron.

Ví dụ 19

Chế phẩm tự do gây dị ứng chứa vi khuẩn probiotic *Lactobacillus acidophilus*

Trehaloza (752g, Cargill Minneapolis, MN), protein đậu Hà lan thủy phân mạnh (167g, Marcor, Carlstadt, NJ), natri alginat (30g, ISP Corp., Wayne, NJ) và Inulin dùng ngay được 50g, Cargill Minneapolis, MN) được phối trộn đồng nhất dưới dạng khô. Hỗn hợp khô được vô trùng bằng cách bổ sung từ từ vào 1000ml nước khử ion hóa nóng ở nhiệt độ 80°C trong máy trộn kiểu hành tinh kép được bọc (DPM, lqt, Ross Engineering, Inc. Savannah, GA,) và việc trộn được tiến hành ở 40 vòng/phút trong thời gian 10 phút cho đến khi tạo ra bùn sệt mịn và sạch. Nhiệt độ hỗn hợp bị giảm đến nhiệt độ 37°C và 1000g hạt đông lạnh chứa *Lactobacillus acidophilus* thu được từ nguồn thương mại được bổ sung từ từ và trộn liên tục trong thời gian 10 phút. Bùn sệt tiếp đó được ép đùn qua kim lỗ 2mm vào bồn chứa nitơ lỏng. Sợi/hạt tiếp đó được loại bỏ khỏi nitơ lỏng được đặt trong túi lá nhôm được bịt kín và được bảo quản trong máy làm lạnh sâu ở nhiệt độ -80°C trong thời gian một vài tuần. Để sấy khô, sợi/hạt đã đông lạnh được dàn đều lên các khay ở dung tích nạp bằng 1000g/sq ft và các khay được đặt trên kệ trong máy sấy đông lạnh (Model 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY) và được sấy khô như được mô tả trong Ví dụ 16. Tổng số đếm

CFU ban đầu của vi khuẩn probiotic trong chế phẩm khô là 10,53 log/g, và khả năng sống mất đi sau thời gian 42 ngày bảo quản dưới điều kiện bảo quản nhanh ở nhiệt độ 40°C và 33%RH là 0,69 log CFU/g.

Ví dụ 20

Chế phẩm dùng ngay được chứa chế phẩm khô theo sáng chế

Chế phẩm khô ổn định chứa *Lactobacillus rhamnosus* được điều chế theo Ví dụ 16 sau đó bằng cách sàng thành hai nhóm cỡ hạt (lớn hơn 50µm và nhỏ hơn 150µm). Chế phẩm dùng ngay được được điều chế bằng cách trộn 99,9g Nutramigen (Mead Johnson; Evansville, IL) với 0,1g hạt chế phẩm khô với cỡ nằm trong khoảng từ 50µm và 150µm). Sản phẩm cuối cùng chứa khoảng 10⁸ cfu *Lactobacillus rhamnosus* trên 100g chế phẩm dùng ngay được.

Ví dụ 21

Phân bổ sung probiotic chứa chế phẩm khô ổn định theo sáng chế

Chế phẩm khô ổn định chứa *Lactobacillus acidophilus* được bào chế thành dạng liều dùng qua đường miệng, như viên nén, viên nén dài, hoặc viên nang. Viên nén có vị cam chứa 99,9g chất nén (dextroza) và 0,1g hạt chế phẩm khô có cỡ nằm trong khoảng từ 50µm đến 150µm được điều chế bằng cách nén trực tiếp trong máy nén kiểu quay bằng cách sử dụng sự hiệu chỉnh lồi tiêu chuẩn tròn 1/2". Sản phẩm cuối cùng chứa khoảng 10⁸ cfu/đơn vị liều dùng. Độ cứng của viên nén nằm trong khoảng từ 8 đến 10kp và thời gian phân hủy bằng khoảng 20 giây. Các viên nén đã nén được đóng gói vào lọ HDPE 180cc chứa 100 viên nén mỗi lọ và được phơi nhiễm với nhiệt độ/độ ẩm được kiểm soát bằng 40°C/33%RH. Sản phẩm phụ thuộc vào thử nghiệm độ ổn định vi trùng học hàng tháng trong khoảng thời gian 12 tháng hoặc cho đến khi làm giảm tổng số đếm trong thử nghiệm nhỏ hơn 1 x 10⁶/đơn vị liều dùng được quan sát.

Ví dụ 22

Đồ uống chức năng chứa chế phẩm khô ổn định theo sáng chế

Hỗn hợp khô chứa (% về trọng lượng) 71% sucroza, 14% maltodextrin, 10% inulin, 2% dextroza, 1% axit xitric khan, 0,3% keo gôm, 0,3% hương liệu, 0,3% tricanxi phosphat và 0,1% hạt chế phẩm probiotic khô (*L. acidophilus*) có

cỡ nằm trong khoảng từ 50µm và 250µm được điều chế. Sản phẩm cuối cùng chứa khoảng 10^9 cfu/đơn vị liều dùng (30g hỗn hợp khô). Sản phẩm được đóng gói trong túi lá nhôm nhỏ (30g đơn vị liều dùng/túi) để uống bằng cách khuấy trong 340ml nước. Độ ổn định của vi khuẩn probiotic trong hỗn hợp đồ uống khô phụ thuộc vào độ ổn định vi trùng học hàng tháng trong thời gian 12 tháng hoặc cho đến khi giảm tổng số đếm thử nghiệm thấp hơn 1×10^7 / đơn vị liều dùng được quan sát.

Ví dụ 23

Điều chế thức ăn probiotic cho vật nuôi

Thực phẩm được vê tròn có bán trên thị trường dùng cho chó được sấy khô trong lò đối lưu có hoạt độ nước bằng 0,1, và tiếp đó được phủ bằng chế phẩm khô probiotic ổn định được điều chế như được mô tả trong Ví dụ 17. Viên vê tròn khô được phun với khoảng 5% hàng rào hơi ẩm trên cơ sở chất béo (hỗn hợp chứa 40% mỡ gà, 40% mỡ thực vật lấy từ cacao và 20% sáp ong), được trộn trong máy trộn trống với chế phẩm bột khô (thường nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,5% tổng thực phẩm cho vật nuôi tạo ra liều dùng bằng 10^8 CFU/g), và cuối cùng được phun lớp phủ bổ sung của hàng rào hơi ẩm trên cơ sở chất béo. Tổng lượng lớp phủ bằng khoảng 15% (thực phẩm cho vật nuôi). Thời gian phủ bằng khoảng 30 phút.

Ví dụ 24

Chế phẩm chứa thức ăn cho cá chứa các vi sinh vật probiotic khác nhau

Thức ăn cho gia súc được vê tròn cho cá theo sáng chế được điều chế bằng hỗn hợp chứa các probiotic khác nhau. Chế phẩm probiotic ổn định chứa hỗn hợp của *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* và *Bifidobacterium lactis* được điều chế như được mô tả trong Ví dụ 15. Thức ăn cho cá hồi có bán trên thị trường (Zeigler Bros., Gardners, PA) đầu tiên được sấy khô trong lò đối lưu đến hoạt độ nước bằng 0,1, và tiếp đó được phủ bằng chế phẩm probiotic trong máy trộn trống. Viên vê tròn (1000g) ban đầu được phun khoảng 5% về trọng lượng của hàng rào hơi ẩm trên cơ sở chất béo (hỗn hợp chứa 40% dầu cá, 40% mỡ thực vật lấy từ cacao và 20% sáp ong), tiếp đó được trộn với 1g chế phẩm probiotic

khô ổn định (để đạt được liều dùng bằng 10^7 cfu/g thức ăn), và cuối cùng được phun lớp phủ bổ sung của hàng rào hàm ẩm trên cơ sở chất béo. Tổng lượng của lớp phủ bằng khoảng 10% (thức ăn cho cá).

Ví dụ 25

Bột khô ổn định chứa enzym

Chế phẩm hydrogel chứa 40 phần trăm trọng lượng của Savinase (Novozymes, Denmark) được điều chế bằng cách trộn 600g chế phẩm được mô tả trong Ví dụ 18 và 400g savinaza trong 1000g dung dịch nước. Chế phẩm hydrogel đã nghiền được làm đông lạnh nhanh trong nitơ lỏng và được làm khô trong lò chân không ở nhiệt độ sấy khô chế phẩm bằng 50°C . Để xác định tải trọng và độ ổn định bảo quản của chế phẩm được sấy khô: mẫu khô được cân chính xác ($<100\text{mg}$) trong ống ly tâm. 200 μl dimetyl sulfoxit (DMSO) được bổ sung vào. Chế phẩm được hòa tan trong dung dịch đệm DMSO bằng cách lắc mạnh. 0,8ml dung dịch chứa 0,05N NaOH, 0,5% SDS và 0,075M axit xitric (muối trinatri) được bổ sung vào mẫu này. Các ống được hòa tan bằng sóng siêu âm trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ 45°C , sau đó bằng cách ly tâm nhanh ở 5000 vòng/phút trong thời gian 10 phút. Phần phân ước của dung dịch DMSO/NaOH/SDS/xitrat trong được đưa vào mỗi lỗ của khay vi thể và được phân tích hàm lượng protein bằng cách sử dụng phương pháp thử nghiệm Bradford. Độ ổn định bảo quản của chế phẩm enzym ổn định cao hơn đáng kể so với enzym khô mà không có chế phẩm theo sáng chế.

Ví dụ 26

Bột khô ổn định chứa vitamin A

Chế phẩm chứa 30 phần trăm trọng lượng của Vitamin A được điều chế bằng cách trộn 320g inulin dùng ngay được, 320g maltodextrin DE-1 (Tate&Lyle, London, UK), 50g natri carboxymetylxenluloza (Ashland Aqualon Functional Ingredients, Wilmington, DE), 10g natri ascorbat và 300g tinh thể vitamin A (BASF Corp., Florham Park, NJ) trong 1000g nước. Chế phẩm ướt được sấy phun trong máy sấy phun Mobile-Minor (GEA Process Engineering Inc., Columbia MD) ở nhiệt độ đầu vào và nhiệt độ đầu ra bằng 180°C và 80°C ,

một cách tương ứng hoặc được làm đông lạnh nhanh trong nitơ lỏng, tiếp đó được dàn trên các khay ở dung tích nạp bằng 1000g/sq ft và được sấy khô như được mô tả trong Ví dụ 16. Chế phẩm vitamin-A ổn định (>80%) ở nhiệt độ 40°C và 75% RH trong thời gian 3 tháng.

Ví dụ 27

Điều chế caroten trong chế phẩm được bảo vệ có tính khả dụng sinh học tăng cường

Chế phẩm bảo vệ và tăng cường tính khả dụng sinh học của caroten nói cách khác sẽ phụ thuộc vào sự oxy hoá bằng các thành phần khác trong thức ăn cho gia súc trong khi bảo quản hoặc sau khi cho sinh vật ăn được điều chế theo chế phẩm và phương pháp theo sáng chế. Chế phẩm chứa 6g chitosan hòa tan trong nước (LSK BioPartners, Inc. Salt Lake City, Utah) được hòa tan trong 200g nước. Bổ sung 90g astaxanthin tự nhiên (Naturose™, Cyanotech Corp., Kailua-Kona, HI) vào dung dịch này và bùn sệt được phun hoặc được ép đùn vào bồn chứa 5% natri tripolyphosphat. Vi hạt hoặc sợi được hydrogel hoá được để hoá rắn ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 4 giờ. Các hạt được loại bỏ khỏi bồn liên kết ngang, được rửa bằng nước và được trộn bằng hỗn hợp phối trộn khô bằng 90g sucroza và 10g casein thủy phân mạnh. Các hạt được nạp đường/protein được làm đông lạnh nhanh và được đặt ngay trên khay ở 500g/sq ft và được sấy đông khô trong máy sấy đông lạnh cho đến khi hoạt độ nước giảm đến nhỏ hơn 0,3. Chế phẩm khô còn được nghiền đến sự phân bố kích cỡ mong muốn và được đóng gói.

Ví dụ 28

Điều chế mồi loài xâm lấn

Mồi được vê tròn cho các loài xâm lấn đích cụ thể được điều chế theo sáng chế. 200g chế phẩm chứa chất diệt sinh vật gây hại như được mô tả trong Ví dụ 1 được điều chế và được bổ sung vào 200gm nước. Bổ sung 90gm Rotenone và 0,5gm canxi phosphat dibazơ vào dung dịch này, sau đó bổ sung 0,5gm gluconolacton vào. Bùn sệt được hóa rắn ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ. Gel rắn được cắt thành sợi mỏng và dài bằng máy cắt

mỏng/thiết bị cắt vụn. Sợi mỏng được nạp lên khay và được đặt trong máy sấy đông lạnh. Nhiệt độ kệ được đặt ở -30°C và chế phẩm được để đông lạnh trước khi tác dụng đủ chân không vào và nhiệt độ kệ tăng lên đến $+60^{\circ}\text{C}$ trong khi sấy qua đêm. Chế phẩm khô được nghiền đến cỡ hạt thích hợp để đặc trưng cho cỡ môi của loài đặc hiệu đích.

Ví dụ 29

Điều chế chất diệt sinh vật gây hại được bảo vệ trong chế phẩm không hòa tan trong nước

Chế phẩm dạng hạt được bảo vệ chứa chất diệt sinh vật gây hại nói cách khác sẽ phụ thuộc vào sự phân thủy các thành phần khác trong chế phẩm trong khi bảo quản hoặc sau khi ứng dụng trong môi trường được điều chế với chế phẩm và phương pháp theo sáng chế. Chế phẩm chứa 6g pectin và 102g sucroza được bổ sung vào 200g nước. Bổ sung 90g chế phẩm khô chứa chất diệt sinh vật gây hại nhạy và hỗn hợp chứa 1,5g canxi phosphat dibazơ và 0,5g canxi clorua vào dung dịch này, sau đó bổ sung 0,85g gluconolacton vào. Bùn sệt được hóa rắn ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 4 giờ, và tiếp đó được cắt thành các sợi mỏng, dài bằng máy cắt mỏng/thiết bị cắt vụn. Sợi mỏng được nạp lên các khay và được sấy khô trong máy sấy đông lạnh để đạt được hoạt độ nước bằng 0,1. Chế phẩm khô tiếp đó được nghiền đến cỡ mong muốn và được đóng gói.

Ví dụ 30

Điều chế chế phẩm probiotic được bảo vệ ở thực vật

Chất kiểm soát sinh học như *Rhizobacteria* được điều chế trong chế phẩm khô theo Ví dụ 18. Hiệu lực của chế phẩm *Rhizobacteria* khô được đánh giá dựa trên sự phát triển của rau diếp dưới các điều kiện thí nghiệm. Liều dùng 100mg chế phẩm khô *Rhizobacteria* trên mỗi cây được cấy vào các bình có cát và được trồng các cây con rau diếp nảy mầm trước (24 giờ). Liều chất dinh dưỡng bằng 5ml dung dịch Hoagland vô trùng được áp dụng cho cây trong chậu. Chậu được sắp xếp ngẫu nhiên trong buồng sinh trưởng được giữ ở nhiệt độ 28°C với chu kỳ sáng 12 giờ. Trong khoảng thời gian 7 ngày sau khi cấy,

thực vật và cát dính được loại bỏ từ từ khỏi chậu. Rễ được rửa trong dung dịch đệm phosphat vô trùng (pH=7,0), và số đo chiều dài rễ được ghi lại.

Ví dụ 31

Sản xuất sản phẩm khô ổn định chứa vi khuẩn probiotic *Lactobacillus acidophilus* (DSM-20356)

Nồng độ vi khuẩn đông lạnh (10g thu được từ quy trình lên men cục bộ) được làm tan ở nhiệt độ 37°C trong bồn nước và hàm lượng chất rắn được điều chỉnh đến 10% trọng lượng ẩm của chất rắn bằng nước chung cất). Khoảng 5g protein đậu Hà Lan thủy phân (sản phẩm thủy phân siêu lọc, Marcor, Carlstadt, NJ) được hòa tan hoàn toàn trong 50g nước ấm và được bổ sung vào môi trường nuôi cấy vi khuẩn đã tan. Khoảng 2,5g trehaloza (Cargill Minneapolis, MN), khoảng 5g Inulin dùng ngay được, khoảng 5g maltodextrin DE-1 (Cargill Minneapolis, MN) và khoảng 1,5g natri alginat (ISP Corp., Wayne, NJ) được trộn đồng nhất dưới dạng khô. Hỗn hợp bột được bổ sung từ từ vào môi trường nuôi cấy vi khuẩn và bước trộn được tiến hành bằng cách sử dụng que trộn nhỏ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 20 phút. Bùn sệt tiếp đó được để chảy nhỏ giọt vào bồn chứa nitơ lỏng. Hạt tiếp đó được loại bỏ nitơ lỏng, được đặt trong túi lá nhôm được bịt kín và được bảo quản trong máy làm lạnh sâu ở nhiệt độ -80°C cho đến khi khô.

Để sấy khô, hạt đông lạnh được dàn đều lên khay ở dung tích nạp nằm trong khoảng từ 500 lên đến 1500g/sq ft và các khay được đặt trên kệ trong máy sấy đông lạnh (Model 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). Bước sấy khô lỏng sơ cấp được khởi đầu bằng cách điều chỉnh áp suất chân không đến khoảng từ 2000 đến 2700mTORR (từ 266,64 đến 359,97 Pa) và nhiệt độ sản phẩm tăng lên và được ổn định trong khoảng từ -10 đến -5°C. Theo thời gian (khoảng từ 10 đến 16 giờ) nhiệt độ sản phẩm tăng lên đến khoảng từ 20 đến 25°C tại điểm mà bước sấy thứ cấp được khởi đầu bằng chân không tối đa (từ 150 đến 200mTORR (từ 20 đến 26,66 Pa)) và nhiệt độ sản phẩm được giữ ở khoảng từ 30 đến 40°C trong thời gian 14 giờ nữa. Chế phẩm được sấy khô hoàn toàn và hoạt độ nước của nó được đo thấp hơn 0,3Aw. Chế phẩm được nghiền bằng

cách sử dụng máy nghiền kiểu búa có bán trên thị trường và các hạt được sàng nhỏ hơn 100 micron.

Khả năng sống của vi khuẩn probiotic ổn định cùng với bột được sấy khô đông lạnh thông thường của vi khuẩn được kiểm tra hàng tuần theo các quy trình pha loãng chuẩn và dàn trên các đĩa thạch LMRS. Fig.16 thể hiện rằng sau thời gian 14 ngày ở 40° RH, độ ổn định của vi khuẩn probiotic được bào chế trong chế phẩm theo sáng chế bằng hai (2) log cao hơn so với độ ổn định của vi khuẩn được sấy khô đông lạnh thông thường. Các kết quả này chứng minh rằng độ ổn định của vi khuẩn probiotic được cải thiện đáng kể về điều kiện độ ẩm cao và điều kiện bảo quản không được làm lạnh khi sử dụng các chế phẩm và phương pháp theo sáng chế.

Ví dụ 32

Sản xuất chế phẩm được kết tụ chất béo được nấu chảy khô ổn định chứa vi khuẩn probiotic *Lactobacillus acidophilus* (DSM-20356)

Mười (10)g chế phẩm bột khô được sản xuất như được mô tả trong Ví dụ 31. Bột khô được đặt trong cốc mở trong bồn nước ở nhiệt độ 40°C. 10g hỗn hợp chất béo được nấu chảy chứa tám (8) phần mỡ thực vật lấy từ cacao và hai (2) phần stearat (27-Stearine, Lodders Crokiaan, Channahon, IL) được bổ sung từ từ vào bột ẩm và trộn đồng thời. Hỗn hợp được làm lạnh xuống đến nhiệt độ 10°C trong khi trộn liên tục cho đến khi thu được cỡ bột kết tụ đồng nhất bằng mắt thường.

Ví dụ 33

Độ ổn định bảo quản trên kệ ở nhiệt độ 40°C và 43% RH hoặc 30°C và 60% RH chế phẩm khô chứa vi khuẩn probiotic *Lactobacillus rhamnosus* sp.

Mười (10)g chế phẩm dạng bột khô chứa vi khuẩn probiotic *Lactobacillus rhamnosus* sp. (thu được từ nguồn lên men cục bộ) được sản xuất như được mô tả trong Ví dụ 31. Chế phẩm ổn định khô được đặt trong bình làm khô và được phơi nhiễm với nhiệt độ 40°C và 43% RH hoặc 30°C và 60% RH. Khả năng sống của probiotic ổn định cùng với bột khô làm lạnh thông thường của vi khuẩn được kiểm tra hàng tuần theo các quy trình chuẩn và được dàn trên

các đĩa thạch LMRS. Fig.17 thể hiện sau thời gian 14 ngày ở nhiệt độ 40°C và 43% RH, độ ổn định của vi khuẩn probiotic được bào chế trong chế phẩm theo sáng chế là ba (3) log cao hơn so với độ ổn định của vi khuẩn được sấy khô lạnh thông thường. Sau thời gian 7 ngày ở nhiệt độ 30°C và 60% RH, độ ổn định của vi khuẩn probiotic mà được bào chế trong chế phẩm theo sáng chế bằng ba (3) log cao hơn so với độ ổn định của vi khuẩn được sấy khô đông lạnh thông thường. Các kết quả này chứng minh rằng độ ổn định của vi khuẩn probiotic được cải thiện đáng kể về các điều kiện bảo quản không được làm lạnh có độ ẩm cao khi sử dụng chế phẩm và phương pháp theo sáng chế.

Ví dụ 34

Sản xuất thức ăn cho động vật chứa chế phẩm khô ổn định chứa vi khuẩn probiotic chống lại vi sinh vật gây bệnh

Khoảng 10kg thức ăn cho động vật có bán trên thị trường cho bê hoặc gà được phủ phía trên trong máy trộn trống với 3% hỗn hợp dầu chứa một phần vật liệu sinh học đã nghiên cứu như được mô tả trong Ví dụ 31 hoặc 32 và hai (2) phần dầu thực vật như dầu ngô. Tổng số đếm CFU của vi khuẩn probiotic là 1×10^9 /g thức ăn cấp vào. Thức ăn cấp vào đã phủ khác được đặt trong buồng có độ ẩm tương đối 43% ở nhiệt độ 40°C và sau thời gian bảo quản 14 ngày trong các điều kiện khắc nghiệt này; sự giảm khả năng sống của vi khuẩn probiotic nhỏ hơn một (1) log của CFU ban đầu. Vật liệu cấp vào được phủ khác được đặt trong buồng có độ ẩm tương đối bằng 33% ở nhiệt độ 30°C và sau sáu (6) tháng bảo quản ở các điều kiện này; sự giảm khả năng sống của vi khuẩn probiotic nhỏ hơn một (1) log CFU ban đầu. Ví dụ này chứng minh rằng vi sinh vật, như *Lactobacillus sp.*, được sử dụng để điều trị cho các con vật khác nhau bao gồm động vật so sánh, có thể được bảo quản trong chế phẩm và phương pháp sấy khô theo sáng chế và tiếp đó được phủ trên thức ăn cấp vào trong thời gian bảo quản dài trên tầng hoặc ít nhất hai (2) tuần trong phễu cấp liệu dưới điều kiện nhiệt độ và độ ẩm thông thường mà thức ăn cấp vào không được phủ được bảo quản.

Ví dụ 35

Sản xuất chế phẩm khô ổn định chứa nấm đơn bào *S. cerevisiae*

Hỗn hợp bột nhão nấm men bánh mì tươi (100g thu được từ thiết bị phân bố cục bộ) được đặt trong bồn nước ở nhiệt độ 10°C. Khoảng 50g protein đậu Hà Lan thủy phân (chất thủy phân siêu lọc, Marcor, Carlstadt, NJ) được hòa tan hoàn toàn trong 500g nước ấm. Dung dịch được làm mát đến nhiệt độ 10°C và được bổ sung vào hỗn hợp bột nhão nấm men trong khi trộn. Khoảng 25g sucroza (mua từ cửa hàng tạp phẩm địa phương), khoảng 50g Inulin dùng ngay được, khoảng 50g maltodextrin DE-1(Cargill Minneapolis, MN), khoảng 12g natri ascorbat (Sigma) và khoảng 15g natri alginat (ISP Corp., Wayne, NJ) được trộn đồng nhất dưới dạng khô. Hỗn hợp bột được bổ sung từ từ vào môi trường nuôi cấy nấm men và việc trộn được tiến hành ở 40 vòng/phút và nhiệt độ 10°C trong thời gian 20 phút. Tiếp đó bùn sệt được chuyển vào bình có đáy được đục lỗ và để chảy nhỏ giọt vào bồn chứa nitor lỏng. Hạt tiếp đó được loại bỏ khỏi nitor lỏng, được đặt trong túi lá nhôm được bịt kín và được bảo quản trong máy làm lạnh sâu ở nhiệt độ -80°C trong thời gian một vài tuần. Bước sấy khô và bước nghiền được thực hiện như được mô tả trong Ví dụ 31.

Ví dụ 36

Sấy phun chế phẩm khô ổn định chứa nấm đơn bào *S. cerevisiae*

Bùn sệt nấm men được điều chế như được mô tả trong Ví dụ 34. Bùn sệt được pha loãng thêm bằng nước chung cất lạnh (10°C) để thu được độ nhớt nằm trong khoảng từ 1000 đến 2000cP. Bùn sệt đã pha loãng được sấy phun (Mobile Minor spray drier, GEA Niro Inc., Columbia, MD), bằng cách sử dụng nhiệt độ đầu vào/đầu ra được điều chỉnh bằng 80°C/60°C.

Ví dụ 37

Phủ hạt ngô bằng chế phẩm khô ổn định chứa nấm đơn bào

Khoảng 10kg hạt ngô có bán trên thị trường được phủ phía trên ở nhiệt độ 40°C trong máy trộn trống bằng hỗn hợp dầu nấu chảy 3% chứa một phần vật liệu sinh học được nghiền như được mô tả trong Ví dụ 34 hoặc Ví dụ 35 và hai (2) phần dầu thực vật như dầu cọ hoặc dầu dừa. Tổng số đếm CFU của nấm men là 1E8/g hạt giống. Hạt giống đã phủ được đặt trong buồng có độ ẩm tương

đổi là 60% ở nhiệt độ 30°C và sau thời gian ba (3) tháng bảo quản trong điều kiện khắc nghiệt này, sự giảm khả năng sống của nấm men nhỏ hơn một (1) log của CFU ban đầu. Ví dụ này chứng minh rằng các vi sinh vật được sử dụng dưới dạng chất cấy trong nông nghiệp như các chủng *Penicillium sp* khác nhau, có thể được bảo quản trong chế phẩm và phương pháp sấy khô theo sáng chế và tiếp đó được phủ trên các hạt trong thời gian bảo quản dài dưới điều kiện nhiệt độ và độ ẩm thông thường mà các hạt không được phủ được bảo quản.

Ví dụ 38

Điều chế chế phẩm hydrogel chứa vi khuẩn probiotic *Bifidobacterium sp*.

Bùn sệt probiotic đặc chứa *Bifidobacterium sp*. được điều chế theo Ví dụ 31. 5g canxi phosphat dibazơ được bổ sung vào hỗn hợp bột. Hỗn hợp bột được bổ sung vào môi trường nuôi cấy probiotic sau khi trộn sau đó bổ sung 5g gluconolacton vào. Bùn sệt được hóa rắn ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian hai (2) giờ tiếp theo để tạo ra hydrogel rắn. Gel rắn được cắt thành sợi mỏng và dài, bằng cách sử dụng máy cắt mỏng/thiết bị cắt vụn có bán trên thị trường. Sợi mỏng được nạp trực tiếp lên các khay dưới dạng ướt hoặc được làm đông lạnh nhanh trong nitơ lỏng và được nạp lên khay ở dung tích nạp bằng 500g/sq ft và được đặt trong máy sấy đông lạnh để sấy khô như được mô tả trong Ví dụ 31. Chế phẩm khô được nghiền thành bột mịn bằng cách sử dụng thiết bị nghiền kiểu búa tiêu chuẩn và được sàng qua sàng 50 micron.

Ví dụ 39

Sản xuất sữa được nuôi cấy ổn định chứa vi khuẩn probiotic

Một trăm (100) gam sữa nuôi cấy tự nhiên đã thanh trùng (Dannon, thu mua từ cửa hàng tạp phẩm địa phương) được bổ sung một nửa (0,5) gam bột được liên kết ngang chứa probiotic ổn định như được mô tả trong Ví dụ 37. Tổng số đếm CFU ban đầu trong sữa nuôi cấy là 1E9/g sữa nuôi cấy. Sữa nuôi cấy này được bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4°C trong thời gian sáu (6) tuần. Sự giảm khả năng sống của vi khuẩn probiotic trong sữa nuôi cấy được làm lạnh là nhỏ hơn một (1) log của CFU ban đầu. Ví dụ này chứng minh rằng vi khuẩn probiotic như các chủng khác nhau của *Lactobacillus* và *Bifidobacterium* có thể

được bảo quản trong chế phẩm và phương pháp sấy theo sáng chế. Tiếp đó vi khuẩn probiotic trong chế phẩm có thể được hydrat hoá hoàn toàn và giữ lại hoạt tính của sản phẩm sữa trong khoảng thời gian kéo dài dưới các điều kiện thông thường mà các vi khuẩn probiotic không được bảo quản không sống sót.

Ví dụ 40

Chế phẩm khô ổn định chứa enzym

Chế phẩm hydrogel chứa 40 phần trăm trọng lượng của phitaza (Marcor, Carlstadt, NJ) được điều chế bằng cách trộn 250g hỗn hợp bột như được mô tả trong Ví dụ 34 và 200g phitaza trong 500ml dung dịch nước chứa khoảng 50g protein đậu Hà Lan thủy phân. Chế phẩm hydrogel đã nghiền được làm đông lạnh nhanh trong nitơ lỏng và được sấy khô trong lò chân không ở nhiệt độ sấy sơ bộ và thứ cấp bằng 50°C. Để xác định tải trọng và độ ổn định bảo quản của chế phẩm khô: mẫu khô được cân chính xác (<100mg) trong ống ly tâm. 200µl dimethyl sulfoxit (DMSO) được bổ sung vào. Chế phẩm được hòa tan trong dung dịch đệm DMSO bằng cách lắc mạnh. 0,8ml dung dịch chứa 0,05N NaOH, 0,5% SDS và 0,075M axit xitric (muối trinati) được bổ sung vào mẫu này. Ống được hòa tan bằng sóng siêu âm trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ 45°C, sau đó bằng ly tâm nhanh ở 5000 vòng/phút trong thời gian 10 phút. Phần phân ước của dung dịch DMSO/NaOH/SDS/xitrat trong được đưa vào lỗ của khay vi thể và được phân tích hàm lượng protein bằng cách sử dụng phương pháp thử nghiệm Bradford. Độ ổn định của chế phẩm khô enzym sau khi phơi nhiễm ở nhiệt độ 95°C trong thời gian 20 phút cao hơn đáng kể so với enzym khô không chứa chế phẩm theo sáng chế.

Ví dụ 41

Chế phẩm khô ổn định chứa chất kiểm soát sinh học thực vật

Chất kiểm soát sinh học như *Rhizobacteria* được điều chế trong chế phẩm khô theo Ví dụ 34. Hiệu lực của chế phẩm *Rhizobacteria* khô được đánh giá sự sinh trưởng của rau diếp dưới điều kiện thí nghiệm. Liều dùng 100mg chế phẩm khô của *Rhizobacteria* trên mỗi cây được cấy vào chậu có cát và được trồng các cây con rau diếp được nảy mầm trước (24 giờ). Liều chất dinh dưỡng

5ml dung dịch Hoagland vô trùng được phun vào các cây trong chậu. Chậu được sắp xếp ngẫu nhiên trong buồng sinh trưởng được giữ ở nhiệt độ 28°C với chu kỳ sáng 12 giờ. Trong thời gian mỗi 7 ngày sau cấy, cây và muối dinh được loại bỏ cẩn thận khỏi chậu. Rễ được rửa trong dung dịch đệm phosphat vô trùng (pH=7,0), và số đo chiều dài rễ được ghi lại. Cây con rau diếp được xử lý bằng chế phẩm *Rhizobacteria* thể hiện sự sinh trưởng tăng cao hơn so với cây con không được xử lý.

Ví dụ 42

Sản xuất các viên nén chứa chế phẩm khô ổn định của vi khuẩn probiotic *Lactobacillus rhamnosus sp.*

Nồng độ vi khuẩn đông lạnh (10g thu được từ quy trình lên men cục bộ) được làm tan ở nhiệt độ 37°C trong bồn nước và hàm lượng chất rắn được điều chỉnh đến 10% trọng lượng ẩm của chất rắn bằng nước chưng cất. Khoảng 5g protein đậu Hà Lan thủy phân (chất thủy phân siêu lọc, Marcor, Carlstadt, NJ) được hòa tan hoàn toàn trong 50g nước ấm và được bổ sung vào môi trường nuôi cấy vi khuẩn được làm tan. Khoảng 5g trehaloza (Cargill Minneapolis, MN) và khoảng 2,5g natri ascorbat được trộn đồng nhất dưới dạng khô. Tùy ý, khoảng 5g Inulin dùng ngay được, khoảng 5g maltodextrin DE-1 (Cargill Minneapolis, MN) và khoảng 1,5g natri alginat (ISP Corp., Wayne, NJ) cũng được bổ sung để tạo ra hỗn hợp bùn sệt ở độ nhớt mong muốn bằng khoảng 50000cP và làm tăng thêm cấu trúc thủy tinh của vật liệu khô. Hỗn hợp bột được bổ sung từ từ vào môi trường nuôi cấy vi khuẩn và việc trộn được tiến hành ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 20 phút. Hỗn dịch vi khuẩn nhớt tiếp đó được chảy nhỏ giọt từ từ vào bồn nitơ lỏng. Hạt đông lạnh tiếp đó được loại bỏ khỏi nitơ lỏng, được đặt trong túi lá nhôm được bịt kín và được bảo quản trong máy làm lạnh sâu ở nhiệt độ -80°C cho đến khi sấy khô.

Để sấy khô, hạt đông lạnh được dàn đều lên khay ở dung tích nạp nằm trong khoảng từ 500 lên đến 1500g/sq ft và các khay được đặt trên kệ trong máy sấy đông lạnh (Model 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). Bước loại bỏ hơi ẩm sơ cấp được khởi động bằng cách điều chỉnh áp suất chân không nằm trong khoảng

từ 2000 đến 2700mTORR (từ 266,64 đến 359,97 Pa) và cho phép nhiệt độ sản phẩm tăng lên và ổn định trong khoảng từ -10°C đến -5°C. Theo thời gian (khoảng từ 10 đến 16 giờ), nhiệt độ sản phẩm tăng lên đến khoảng từ 20°C đến 25°C tại điểm đó bước sấy khô thứ cấp được khởi đầu ở chân không tối đa (từ 50 đến 200mTORR (từ 20 đến 26,66 Pa)) và nhiệt độ sản phẩm được giữ ở khoảng từ 30 đến 45°C trong thời gian 14 giờ nữa. Chế phẩm được sấy khô hoàn toàn và hoạt độ nước của nó được đo thấp hơn 0,3Aw. Chế phẩm được nghiền bằng cách sử dụng máy nghiền cà phê và các hạt được sàng nhỏ hơn 250 micron.

Để nén viên nén, chế phẩm probiotic khô và ổn định (100mg) được trộn với 400mg maltodextrin DE-1 chứa 2% trọng lượng/trọng lượng magie stearate và 2% trọng lượng/trọng lượng silic dioxit được hun khói ưa nước (AEROSIL® 200, Evonik Industries) và được nén trong thiết bị nén viên tròn được giữ bằng tay (bằng cách sử dụng vỏ bọc đường kính viên nén ½" (1,27 cm)). Viên nén tương tự chứa bột được sấy khô lạnh thông thường chứa vi khuẩn probiotic (probiotic tự do) cũng được điều chế và được sử dụng để so sánh với các viên nén chứa vi khuẩn probiotic được bảo vệ.

Khả năng sống trước và sau khi tạo viên nén và trong khi bảo quản ở nhiệt độ 40°C và 43% RH của vi khuẩn probiotic ổn định cùng với probiotic tự do được kiểm tra hàng tuần, theo các quy trình pha loãng chuẩn và dàn trên các đĩa thạch LMRS. Fig.18 thể hiện rằng sự giảm theo hàm log khả năng sống của vi khuẩn probiotic tự do trong quy trình tạo viên nén trong khi khả năng sống của vi khuẩn được bảo vệ cơ bản được giữ lại là bằng nhau sau quy trình tạo viên nén. Sau thời gian 14 ngày bảo quản ở nhiệt độ 40°C và 43% RH, khả năng sống của vi khuẩn probiotic được bào chế trong chế phẩm theo sáng chế, bị giảm không đáng kể bằng khoảng 0,3 log trong khi khả năng bảo quản của vi khuẩn được sấy khô lạnh thông thường bằng khoảng 0,6 log. Các kết quả này chứng minh rằng chế phẩm và phương pháp theo sáng chế tạo ra sự bảo vệ đáng kể đối với áp suất nén và nhiệt độ có liên quan trong khi tạo viên nén vi khuẩn

probiotic và trong khi bảo quản ở điều kiện độ ẩm cao và điều kiện bảo quản không được làm lạnh.

Ví dụ 43

Điều chế các viên nén đa vitamin/probiotic chứa chế phẩm khô ổn định của vi khuẩn probiotic *Lactobacillus rhamnosus* sp.

Bảo vệ chế phẩm và phương pháp như được bộc lộ ở đây tiếp đó khai thác thêm được rằng trong các viên nén chứa các thành phần đa vitamin. Mười (10)g chế phẩm bột khô được sản xuất như được mô tả trong Ví dụ 42. Để tạo viên nén, chế phẩm probiotic ổn định và khô (100mg) được trộn với 400mg bột đa vitamin có bán trên thị trường (Centrum®, Pfizer) chứa 2% trọng lượng/trọng lượng magie stearat và 2% trọng lượng/trọng lượng silic dioxit được hun khói ưa nước (AEROSIL® 200, Evonik Industries) và được nén trong thiết bị nén viên tròn được giữ bằng tay (bằng cách sử dụng vỏ bọc đường kính viên nén ½" (1,27 cm)). Các viên nén tương tự chứa bột được sấy khô lạnh thông thường chứa vi khuẩn probiotic (probiotic tự do) cũng được điều chế và được sử dụng để so sánh với các viên nén chứa vi khuẩn probiotic được bảo vệ. Viên nén tạo thành tiếp đó được thử nghiệm về tổng số đếm probiotic tổng số. Các kết quả được thể hiện trên Fig.19.

Như được thể hiện trên Fig.19, sự giảm khả năng sống theo hàm hai (2) log của vi khuẩn probiotic tự do khi nén viên với các thành phần đa vitamin trong khi khả năng sống của vi khuẩn được bảo vệ bị giảm ít hơn một log. Sau thời gian 14 ngày bảo quản ở nhiệt độ 40°C và 43% RH, khả năng sống của vi khuẩn probiotic được bào chế trong chế phẩm theo sáng chế cơ bản bằng nhau trong khi khả năng sống của vi khuẩn được sấy khô lạnh thông thường bị tụt thêm ba (3) log. Các kết quả này chứng minh rằng chế phẩm và phương pháp theo sáng chế cũng tạo ra sự bảo vệ đáng kể với vật liệu sinh học nhạy khỏi các hợp chất gây hư hại khác trong hỗn hợp viên nén, nhờ đó cho phép trộn trong một viên nén các vật liệu sinh học khác nhau mà không ảnh hưởng đến toàn bộ hiệu lực của chúng.

Ví dụ 44

Tạo viên nén chứa chế phẩm khô ổn định chứa enzym được bảo vệ

Chế phẩm khô và ổn định chứa proteaza hoặc lipaza (cả hai đều từ Sigma) được điều chế như được mô tả trong Ví dụ 42. Chế phẩm khô cuối cùng chứa 10% proteaza hoặc lipaza, 40% trehaloza, 20% protein đậu Hà lan thủy phân mạnh, 10% natri ascorbat. Ngoài ra, 6% natri alginat và 14% inulin cũng được chứa trong chế phẩm.

Để tạo viên nén, chế phẩm enzym khô (mỗi viên 50mg) được trộn với 450mg maltodextrin DE-1 chứa 2% trọng lượng/trọng lượng magie stearat và 2% trọng lượng/trọng lượng silic dioxit được hun khói ưa nước và được nén trong thiết bị nén viên tròn được giữ bằng tay (bằng cách sử dụng vỏ bọc đường kính viên nén ½" (1,27 cm)). Viên nén chứa lượng cân bằng của cả hai enzym được bảo vệ cũng được điều chế bằng cách trộn và 25mg proteaza và 25mg lipaza với 450mg hỗn hợp maltodextrin DEI. Các viên nén tương tự chứa bột khô enzym dưới dạng tự do (enzym tự do hoặc hỗn hợp của cả hai) cũng được điều chế và được sử dụng để so sánh với các viên nén chứa các enzym được bảo vệ.

Hoạt tính còn lại của proteaza và lipaza sau khi nén tương ứng với hoạt tính của chúng trong hỗn hợp bột trước khi tạo viên nén được xác định theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật bằng cách sử dụng Azocasein và pNP-palmitat dưới dạng cơ chất, một cách tương ứng.

Như được thể hiện trên Fig.20, proteaza tự do dạng viên hoặc đơn lẻ hoặc kết hợp với lipaza tự do dẫn đến sự mất hoạt tính khoảng 40% trong khi proteaza được bảo vệ không mất bất kỳ hoạt tính nào khi được tạo thành dạng viên riêng lẻ và chỉ khoảng 17% khi được tạo thành hỗn hợp với lipaza được bảo vệ. Việc tạo viên nén lipaza tự do hoặc được bảo vệ không làm mất hoạt tính đáng kể nào, tuy nhiên, việc tạo viên nén lipaza tự do với sự có mặt của proteaza tự do dẫn đến mất hoạt tính 64%, trong khi việc tạo viên nén lipaza được bảo vệ với sự có mặt của proteaza được bảo vệ chỉ mất 33% hoạt tính. Các kết quả này chứng minh rằng chế phẩm và phương pháp theo sáng chế tạo ra sự bảo vệ đáng kể đối với áp suất nén và nhiệt có liên quan trong khi tạo viên nén

cho các enzym. Các kết quả cũng thể hiện rằng chế phẩm và phương pháp theo sáng chế tạo ra sự bảo vệ khỏi enzym tiêu hoá khác trong hỗn hợp viên nén, nhờ đó cho phép trộn lẫn các enzym mong muốn khác nhau trong một viên nén mà không ảnh hưởng đến toàn bộ hoạt tính của chúng.

Ví dụ 45

Tạo viên nén thức ăn cho động vật chứa chế phẩm khô ổn định chứa vi khuẩn probiotic chống lại các vi sinh vật gây bệnh

Sự bảo vệ các chế phẩm và phương pháp được bộc lộ ở đây được nghiên cứu thêm trong các viên nén chứa các thành phần thức ăn cho động vật. Khoảng 100g chế phẩm khô và chế phẩm ổn định chứa vi khuẩn probiotic *L. acidophilus* sp. được điều chế và sấy khô như được mô tả trong Ví dụ 42. Chế phẩm khô cuối cùng chứa 10% sinh khối tế bào vi khuẩn khô, 54% trehaloza, 20% protein đậu Hà lan thủy phân mạnh, 10% natri ascorbat. Ngoài ra, 6% natri alginat cũng chứa trong chế phẩm.

Khoảng 10kg thức ăn cho chó hoặc viên tròn thức ăn chế biến sẵn cho gà có bán trên thị trường được sấy khô trong không khí qua đêm ở nhiệt độ 40°C và tiếp đó được nghiền mịn thành bột chảy tự do. Chế phẩm khô ổn định được trộn với bột thức ăn và được nén trong thiết bị nén viên tròn được giữ bằng tay (bằng cách sử dụng vỏ bọc được kính viên tròn 1/8-7/8" (từ 0,317 cm đến 2,22 cm)) để tạo ra khoảng từ 200 đến 2000mg cỡ viên tròn chứa khoảng mười (10) tỷ tế bào sống trên mỗi gam thức ăn. Để điều trị cho gà, các viên tròn thức ăn probiotic được đổ từ từ vào 100kg thức ăn thương mại tiêu chuẩn trong khi trộn. Thức ăn chế biến sẵn được xử lý dễ dàng cho chim ăn và để tăng cường tính kháng đối với nguồn bệnh như *salmonella*. Đối với thử nghiệm về tính ổn định, các viên tròn probiotic được đặt trong buồng có độ ẩm tương đối là 43% ở nhiệt độ 40°C và sau thời gian 14 ngày bảo quản trong điều kiện khắc nghiệt này, sự giảm khả năng sống của vi khuẩn probiotic nhỏ hơn một (1) log của CFU ban đầu. Ví dụ này chứng minh rằng vi sinh vật được sử dụng để điều trị cho động vật khác nhau bao gồm động vật so sánh như *Lactobacillus* sp. khác nhau có thể được bảo vệ trong chế phẩm và phương pháp sấy khô theo sáng chế và tiếp đó

được nén trong máy nén viên và được cung cấp thức ăn tiêu chuẩn trong phễu nạp liệu thông thường dưới điều kiện nhiệt độ và độ ẩm thông thường.

Ví dụ 46

Điều chế các viên nén đồ uống sủi bọt có ga chứa chế phẩm khô ổn định của vi khuẩn probiotic

Khoảng 10g bột chế phẩm khô và ổn định chứa vi khuẩn probiotic *L. acidophilus sp.* hoặc *Bifidobacterium sp.* được điều chế và được sấy khô như được mô tả trong Ví dụ 42 và 45.

Viên nén sủi bọt như Alka Seltzer®, Fizzies® hoặc đồ uống thể thao được nghiền mịn thành bột chảy tự do. Chế phẩm probiotic khô ổn định được trộn với bột sủi bọt và được nén trong thiết bị nén viên tròn được giữ bằng tay (bằng cách sử dụng vỏ bọc đường kính viên nén 7/8" (2,22 cm)) để tạo ra viên nén cỡ khoảng 2000mg chứa khoảng mười (10) tỷ tế bào sống trên mỗi viên nén. Đối với thử nghiệm về độ ổn định các viên nén sủi bọt probiotic được đặt trong buồng có độ ẩm tương đối 43% ở nhiệt độ 33°C và sau thời gian 90 ngày bảo quản trong các điều kiện khắc nghiệt này, sự giảm khả năng sống của vi khuẩn probiotic nhỏ hơn một (1) log của CFU ban đầu. Ví dụ này chứng minh rằng vật liệu sinh học nhạy như vi khuẩn probiotic sống có thể được bảo vệ và được ổn định trong chế phẩm và phương pháp sấy khô theo sáng chế và tiếp đó được nén trong máy nén viên và được bảo quản dưới các điều kiện nhiệt độ và áp suất khắc nghiệt.

Ví dụ 47

Điều chế các viên nén chứa chế phẩm khô ổn định của vi khuẩn probiotic để điều trị bệnh nhiễm khuẩn âm đạo như vi khuẩn *vaginosis*

Khoảng 15g bột chế phẩm khô và ổn định chứa vi khuẩn probiotic *L. acidophilus sp.* được điều chế và được sấy khô như được mô tả trong Ví dụ 1 và 4.

Chế phẩm probiotic ổn định được phối trộn với 74g lactoza, 10g tinh bột ngô, 0,5g magie stearat, 0,01g natri carboxymetylxenluloza, 0,01g polyvinylpyrrolidin và 0,01g silic dioxit được hun khói ưa nước và được trộn

trong thời gian 15 phút. Hỗn hợp dạng bột được nén trong thiết bị nén viên nén được giữ bằng tay. Trọng lượng của viên nén tạo thành bằng khoảng 1,5g. Độ cứng tối đa của viên nén nằm trong khoảng từ 6 đến 8kg. Viên nén được phân rã trong nước trong khoảng thời gian khoảng 30 giây.

Ví dụ 48

Sản xuất hỗn dịch dầu chứa chế phẩm khô ổn định của vi khuẩn probiotic *Lactobacillus acidophilus* (DSM-20356)

Dung dịch cô đặc *L. acidophilus* đông lạnh (200g thu được từ quy trình lên men cục bộ) được làm tan ở nhiệt độ 37°C trong bồn nước và được bổ sung 200g dung dịch protein đậu Hà lan 3% được thủy phân (chất thủy phân siêu lọc, Marcor, Carlstadt, NJ). Hỗn dịch vi khuẩn được ly tâm ở 4000g trong thời gian 15 phút (Sorvall RC-5B, Du-Pont Company, Wilmington, DE) và phần nổi trên mặt được gạn ra. Chất kết tủa vi khuẩn được đưa lên đến trọng lượng ban đầu (200g) bằng 3% dung dịch protein đậu Hà Lan thủy phân. 50g protein đậu Hà Lan thủy phân bổ sung được hòa tan hoàn toàn trong 80g nước ấm, pH được điều chỉnh đến 9 bằng 20% dung dịch NaOH và được bổ sung vào môi trường nuôi cấy vi khuẩn. Tám mươi lăm phẩy sáu (85,6)g sucroza (thu mua từ chợ địa phương), 30g Xyclodextrin-7 (Cargill Minneapolis, MN), 20g natri ascorbat (Sigma) và 15g natri alginat (ISP Corp., Wayne, NJ) được trộn đồng nhất dưới dạng khô. Hỗn hợp bột được bổ sung từ từ vào môi trường nuôi cấy vi khuẩn và việc trộn được tiến hành trong máy trộn kiểu hành tinh 1qt (Charles Ross & Son Company, Hauppauge, New York) ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 20 phút. Tiếp đó bùn sệt được chảy nhỏ giọt từ từ vào bồn chứa nitơ lỏng. Hạt đông lạnh tiếp đó được loại bỏ khỏi nitơ lỏng, được đặt trong túi lá nhôm được bịt kín và được bảo quản trong máy làm lạnh sâu ở nhiệt độ -80°C cho đến khi sấy khô.

Để sấy khô, hạt đông lạnh được dàn đều lên khay ở dung tích nạp nằm trong khoảng từ 500 lên đến 1500g/sq ft và các khay được đặt trên kệ trong máy sấy đông lạnh (Model 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). Bước sấy sơ bộ được khởi đầu bằng cách điều chỉnh áp suất chân không đến khoảng từ 2000 đến 2700mTORR (từ 266,64 đến 359,97 Pa) và nhiệt độ sản phẩm tăng lên và được

ổn định ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -12°C đến -5°C . Theo thời gian (từ khoảng 10 đến 16 giờ) nhiệt độ sản phẩm tăng lên đến khoảng từ 20 đến 25°C tại điểm đó bước sấy thứ cấp được khởi động ở chân không tối đa (từ 100 đến 150mTORR (từ 20 đến 26,66 Pa)) và nhiệt độ sản phẩm được duy trì trong khoảng từ 30 đến 40°C trong thời gian 14 giờ nữa. Chế phẩm được sấy khô hoàn toàn và hoạt độ nước được đo thấp hơn 0,3Aw. Chế phẩm được nghiền bằng cách sử dụng máy nghiền kiểu búa có bán trên thị trường và các hạt được sàng nhỏ hơn 250 micron.

Khả năng sống của chế phẩm ổn định của vi khuẩn probiotic được thử nghiệm ở nhiệt độ 40°C và 43% RH trong thời gian 14 ngày dưới dạng bột khô hoặc trong hỗn dịch dầu ngô (Ig bột khô được trộn trong 100g dầu) hoặc sau khi phủ 10g hỗn dịch dầu lên 45g viên tròn thức ăn cho gà (viên tròn thức ăn đầu tiên được làm thích nghi trong buồng có độ ẩm 33% RH trong thời gian hai tuần). Sau thời gian 14 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ 40°C và 43% RH, vi khuẩn probiotic chỉ mất đi 0,5 log CFU/g khi được giữ dưới dạng khô, 0,34 log khi được trộn trong hỗn dịch dầu và 0,65 log khi được phủ lên thức ăn cho gà. Các kết quả này chứng minh rằng khả năng sống của vi khuẩn probiotic được bảo quản trong các ứng dụng khác nhau sau thời gian 14 ngày phơi nhiễm ở độ ẩm cao và điều kiện bảo quản không được làm lạnh khi sử dụng chế phẩm và phương pháp theo sáng chế.

Ví dụ 49

Sản xuất chế phẩm khô ổn định chứa thực khuẩn thể sống chống lại *Vibrio anguillarum*

Môi trường nuôi cấy thể thực khuẩn sống đặc (100g thu được từ nhà sản xuất) được đặt trong máy trộn kiểu hành tinh được bọc ở nhiệt độ 10°C . Khoảng 50g protein đậu Hà Lan thủy phân (chất thủy phân siêu lọc, Marcor, Carlstadt, NJ) được hòa tan hoàn toàn trong 300g nước ấm. Dung dịch được làm lạnh đến nhiệt độ 10°C và được bổ sung vào môi trường nuôi cấy thể thực khuẩn trong khi trộn. Một trăm bảy mươi bốn (174)g sucroza (thu được từ chợ địa phương), 60g xyclodextrin-7 (Cargill Minneapolis, MN), 40g natri ascorbat (Sigma) và

30g natri alginat (ISP Corp., Wayne, NJ) được trộn đồng nhất dưới dạng khô. Hỗn hợp bột được bổ sung từ từ vào môi trường nuôi cấy thể thực khuẩn và bước trộn được tiến hành trong máy trộn kiểu hành tinh 1qt ở nhiệt độ 10°C trong thời gian 20 phút. Bùn sệt tiếp đó được chảy nhỏ giọt từ từ vào bồn chứa nitơ lỏng. Hạt đông lạnh tiếp đó được loại bỏ khỏi nitơ lỏng, được đặt trong túi lá nhôm được bịt kín và được bảo quản trong máy làm lạnh sâu ở nhiệt độ -80°C cho đến khi sấy khô. Việc sấy khô và nghiền được thực hiện như được mô tả trong Ví dụ 48. Mười (10) gam bột chế phẩm khô được trộn với 100g dầu cá và hỗn dịch được phủ trên 10kg viên tròn thức ăn cho cá hồi Atlantic. Thức ăn được phủ tiếp đó được bảo quản dưới điều kiện bảo quản trong kho hàng thông thường. Khả năng sống của vi khuẩn trong thức ăn cho cá được bảo quản sau thời gian 14 ngày phơi nhiễm với độ ẩm cao và điều kiện bảo quản không được làm lạnh khi sử dụng chế phẩm và phương pháp theo sáng chế.

Mặc dù sáng chế được minh họa và được mô tả ở đây theo các phương án cụ thể, tuy nhiên sáng chế không dùng để giới hạn các chi tiết được chỉ ra. Hơn nữa, các cải biến khác nhau có thể được tiến hành chi tiết trong phạm vi và mức độ tương đương với các điểm bảo hộ mà không tách rời khỏi sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm ổn định khô ở trạng thái thủy tinh vô định hình chứa vật liệu hoạt tính sinh học, một hoặc nhiều disacarit với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 50%, một hoặc nhiều oligosacarit với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 80%, một hoặc nhiều polysacarit với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10%, một hoặc nhiều protein thủy phân với lượng nằm trong khoảng từ 0,5 đến 40% và một hoặc nhiều muối của axit carboxylic, mỗi tỷ lệ phần trăm dựa trên tổng trọng lượng của chế phẩm, trong đó một hoặc nhiều oligosacarit gồm có cyclodextrin, trong đó vật liệu hoạt tính sinh học gồm có vi sinh vật sống, và trong đó chế phẩm này thể hiện sự giảm ít hơn 1 log đơn vị hình thành khuẩn lạc trên gam (CFU/g) sau 14 ngày ở nhiệt độ 40°C và độ ẩm tương đối (RH) là 43%.
2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó một hoặc nhiều protein thủy phân được chọn từ nhóm bao gồm casein thủy phân, protein dịch sữa thủy phân, protein đậu Hà Lan thủy phân, protein đậu tương thủy phân và hỗn hợp của chúng.
3. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó một hoặc nhiều polysacarit được chọn từ nhóm bao gồm xenluloza axetat phtalat (CAP), carboxy-metyl-xenluloza, pectin, muối của axit alginic, hydroxyl propyl metyl xenluloza (HPMC), metyl xenluloza, caragenan, gôm gelan, gôm guar, keo gôm, gôm xanthan, gôm Locust bean, chitosan và dẫn xuất của chitosan, collagen, axit polyglycolic, tinh bột, tinh bột được cải biến và hỗn hợp của chúng.
4. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó một hoặc nhiều disacarit được chọn từ nhóm bao gồm trehaloza, sucroza, lactoza và hỗn hợp của chúng.
5. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó axit carboxylic được chọn từ nhóm bao gồm axit lactic, axit ascorbic, axit maleic, axit oxalic, axit malonic, axit malic, axit succinic, axit citric, axit gluconic và axit glutamic.
6. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó vi sinh vật sống là vi khuẩn probiotic.

7. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này được sấy khô bằng một hoặc nhiều quy trình được chọn từ nhóm bao gồm quy trình sấy khô bằng không khí, sấy khô chân không, sấy khô tầng sôi và sấy phun.
8. Chất lỏng được hoàn nguyên, bột được nghiền, viên nén, viên vê tròn, viên nang, thực phẩm, thức ăn cho gia súc hoặc sản phẩm hạt đã phủ được điều chế bằng chế phẩm theo điểm 1.
9. Sản phẩm dinh dưỡng, dược phẩm, nông sản hoặc sản phẩm vacxin chứa chế phẩm theo điểm 1.
10. Thực phẩm, chất phụ gia thực phẩm, thức ăn cho động vật, chất phụ gia trong thức ăn cho động vật, sản phẩm dinh dưỡng, dược phẩm, nông sản hoặc sản phẩm vacxin có dạng thanh, chế phẩm lỏng, hỗn dịch dạng keo, bột, viên nén, viên nang hoặc hạt được phủ, được điều chế bằng chế phẩm theo điểm 1.
11. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó protein thủy phân là protein thực vật.
12. Chế phẩm ổn định khô ở trạng thái thủy tinh vô định hình, chứa vật liệu hoạt tính sinh học, một hoặc nhiều disacarit với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 50%, một hoặc nhiều oligosacarit với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 80%, một hoặc nhiều polysacarit với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10%, một hoặc nhiều protein thủy phân với lượng nằm trong khoảng từ 0,5 đến 40% và một hoặc nhiều muối của axit carboxylic, mỗi tỷ lệ phần trăm dựa trên tổng trọng lượng của chế phẩm, trong đó vật liệu hoạt tính sinh học gồm có vi sinh vật sống, trong đó chế phẩm này thể hiện sự giảm ít hơn 1 log đơn vị CFU/g sau 14 ngày ở nhiệt độ 40°C và độ ẩm tương đối (RH) là 43%, và trong đó chế phẩm này được điều chế bằng phương pháp bao gồm các bước:
 - (a) kết hợp vật liệu hoạt tính sinh học với một hoặc nhiều disacarit, một hoặc nhiều oligosacarit, một hoặc nhiều polysacarit, một hoặc nhiều protein thủy phân, và một hoặc nhiều muối của axit carboxylic trong dung môi chứa nước để tạo ra hỗn hợp bùn sệt;
 - (b) làm đông lạnh nhanh bùn sệt trong nitơ lỏng để tạo ra các hạt đông lạnh rắn ở dạng hạt, giọt nhỏ hoặc sợi;

(c) sấy sơ bộ các hạt đông lạnh bằng cách làm bay hơi dưới chân không ở nhiệt độ cao hơn điểm kết đông của các hạt để tạo ra chế phẩm đã được sấy sơ bộ; và
 (d) sấy thứ cấp chế phẩm đã được sấy sơ bộ ở chân không tối đa và nhiệt độ bằng 20°C hoặc cao hơn trong khoảng thời gian đủ để làm giảm hoạt độ nước của chế phẩm đã được sấy sơ bộ xuống thấp hơn 0,3Aw, nhờ đó chế phẩm được điều chế.

13. Chế phẩm theo điểm 12, trong đó vi sinh vật sống là vi khuẩn probiotic.

14. Chế phẩm theo điểm 12, trong đó một hoặc nhiều disacarit được chọn từ nhóm bao gồm trehaloza, sucroza, lactoza, và hỗn hợp của chúng.

15. Chế phẩm theo điểm 12, trong đó một hoặc nhiều oligosacarit được chọn từ nhóm bao gồm xyclodextrin, inulin, maltodextrin, dextran, fructo-oligosacarit (FOS), galacto-oligosacarit (GOS), manan-oligosacarit (MOS) và hỗn hợp của chúng.

16. Chế phẩm theo điểm 12, trong đó một hoặc nhiều oligosacarit gồm có xyclodextrin.

17. Chế phẩm theo điểm 12, trong đó một hoặc nhiều polysacarit được chọn từ nhóm bao gồm xenluloza axetat phtalat (CAP), carboxy-metyl-xenluloza, pectin, natri alginat, muối của axit alginic, hydroxyl propyl metyl xenluloza (HPMC), metyl xenluloza, caragenan, gôm gelan, gôm guar, keo gôm, gôm xanthan, gôm Locust bean, chitosan và dẫn xuất của chitosan, collagen, axit polyglycolic, tinh bột, tinh bột được cải biến và hỗn hợp của chúng.

18. Chế phẩm theo điểm 12, trong đó một hoặc nhiều protein thủy phân được chọn từ nhóm bao gồm casein thủy phân, protein dịch sữa thủy phân, protein đậu Hà Lan thủy phân, protein đậu tương thủy phân hoặc hỗn hợp của chúng.

19. Chế phẩm theo điểm 12, trong đó axit carboxylic được chọn từ nhóm bao gồm axit lactic, axit ascorbic, axit maleic, axit oxalic, axit malonic, axit malic, axit succinic, axit xitric, axit gluconic và axit glutamic.

20. Chế phẩm theo điểm 12, trong đó protein thủy phân là protein thực vật.

1/20

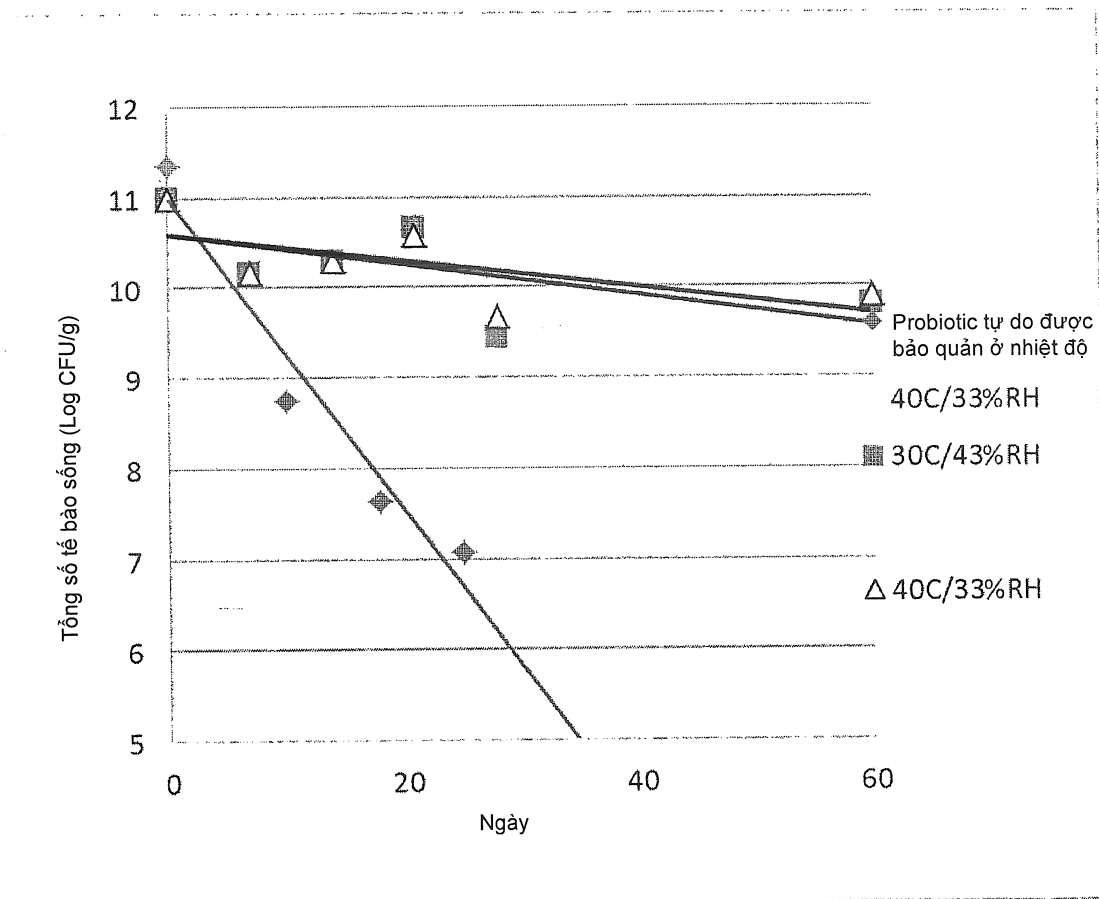


FIG. 1

2/20

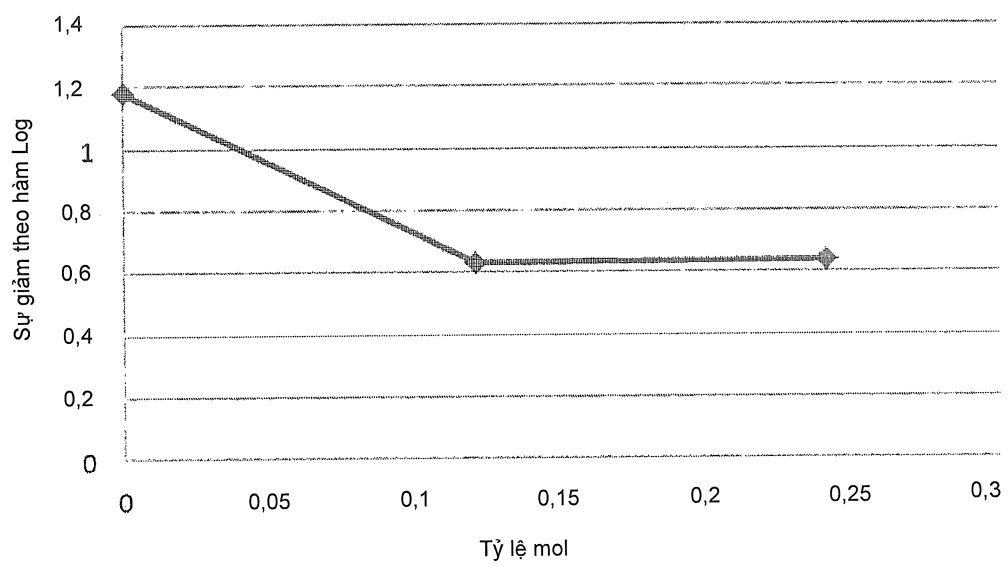


FIG. 2

3/20

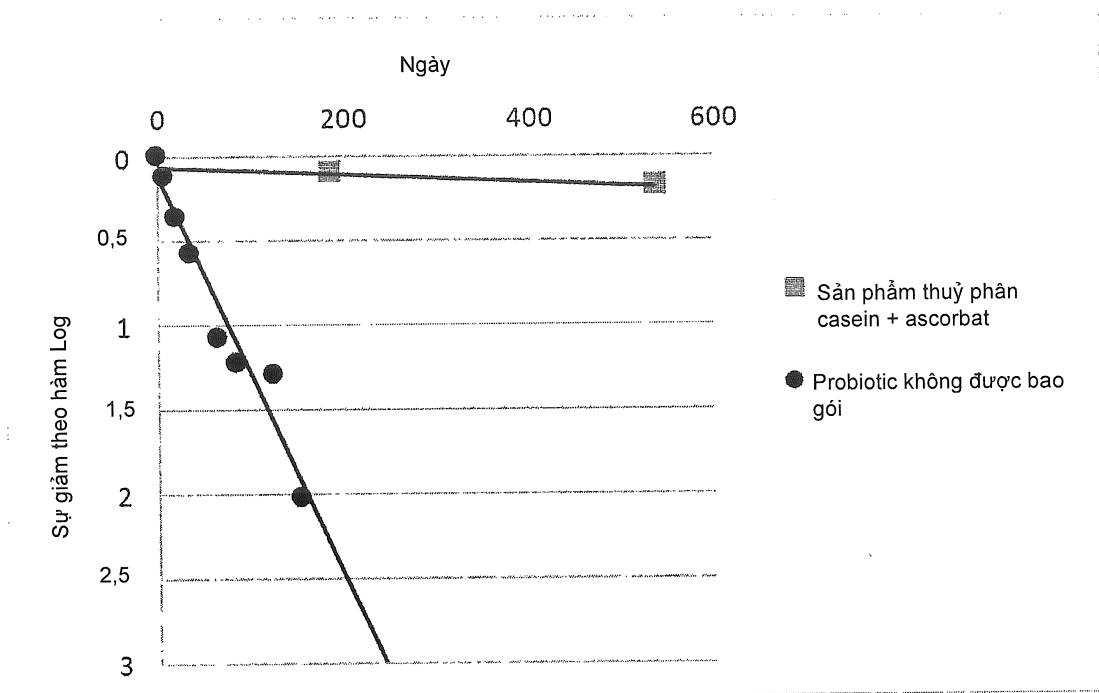


FIG. 3

4/20

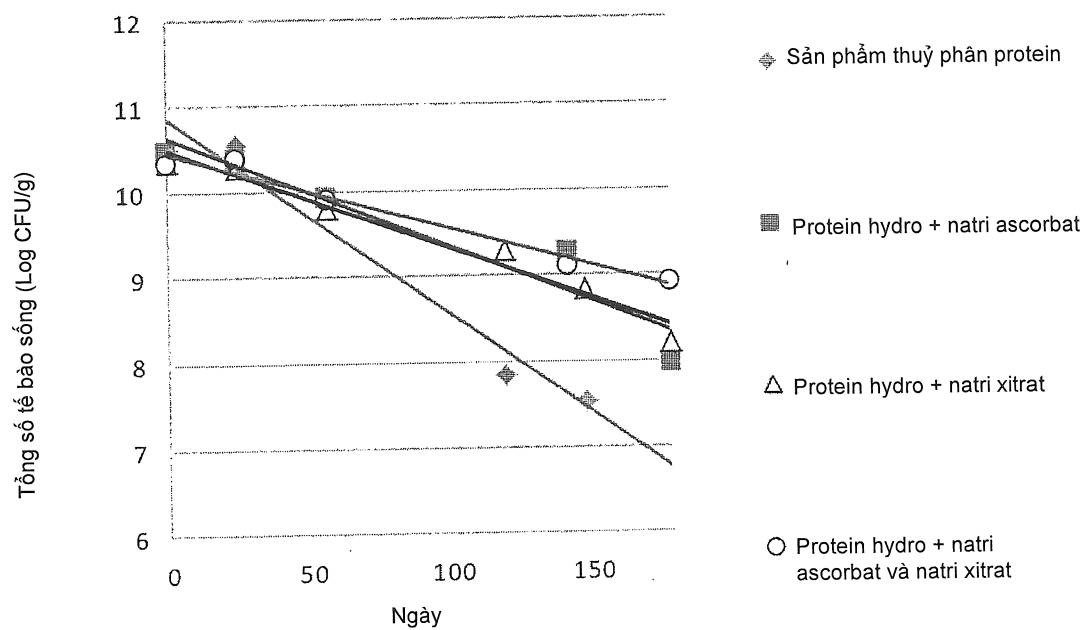


FIG. 4

5/20

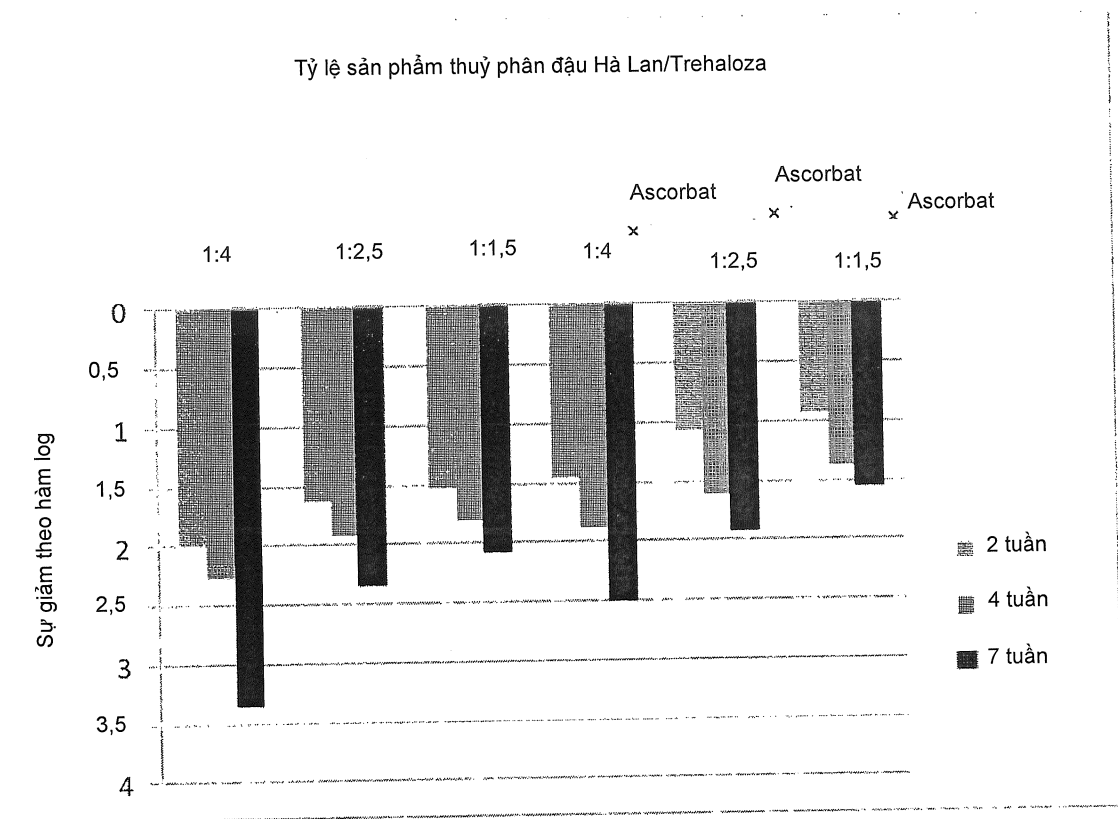


FIG. 5

6/20

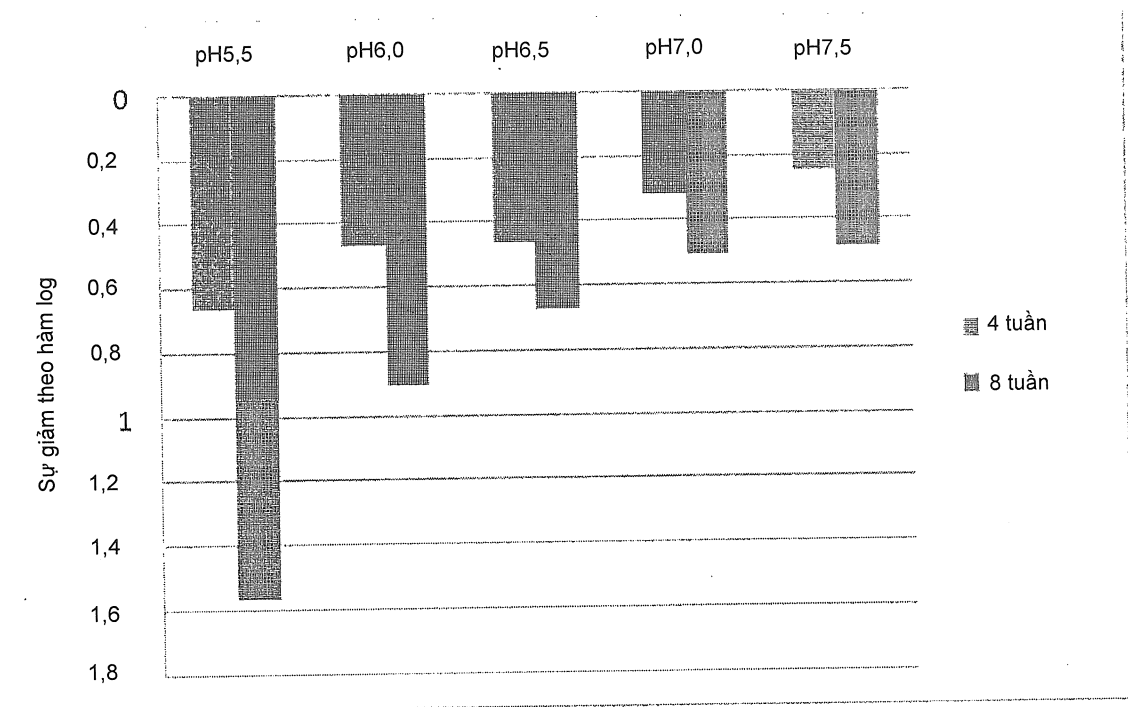


FIG. 6

7/20

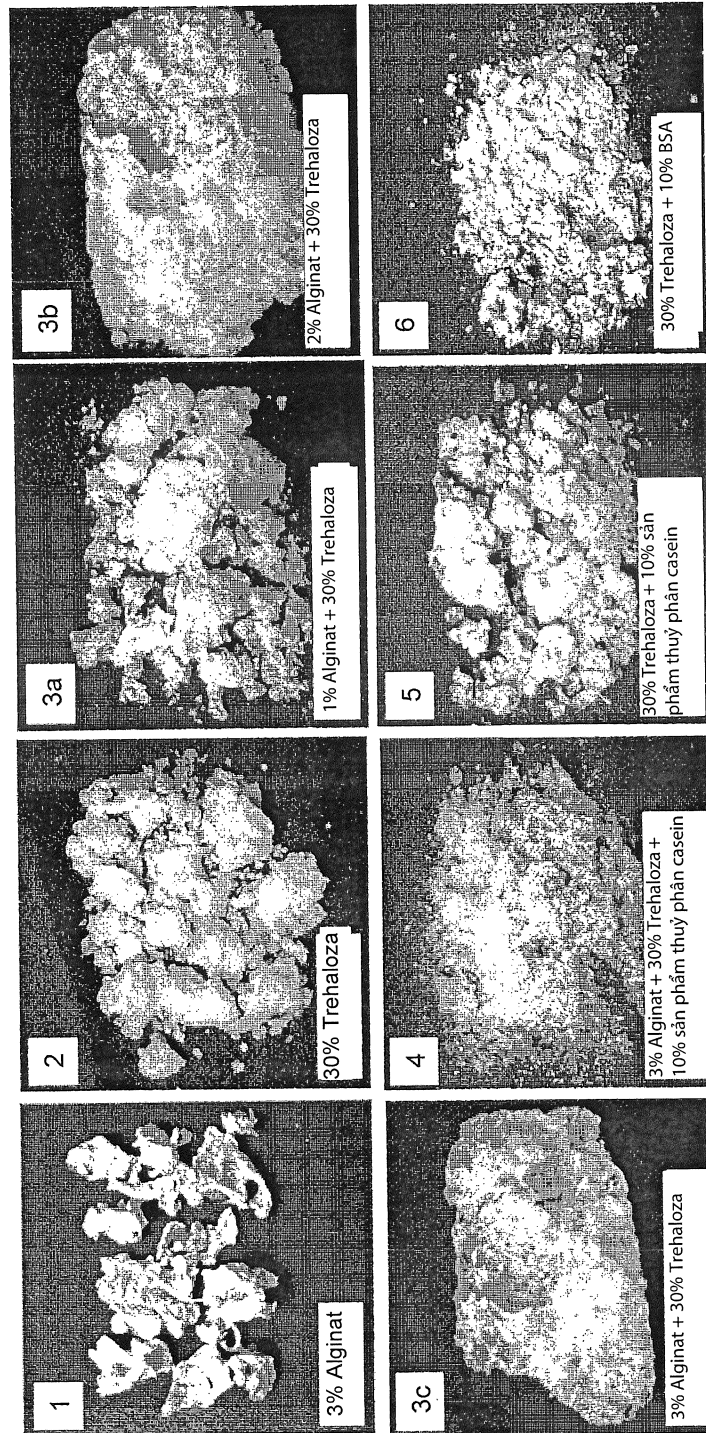


FIG. 7

8/20

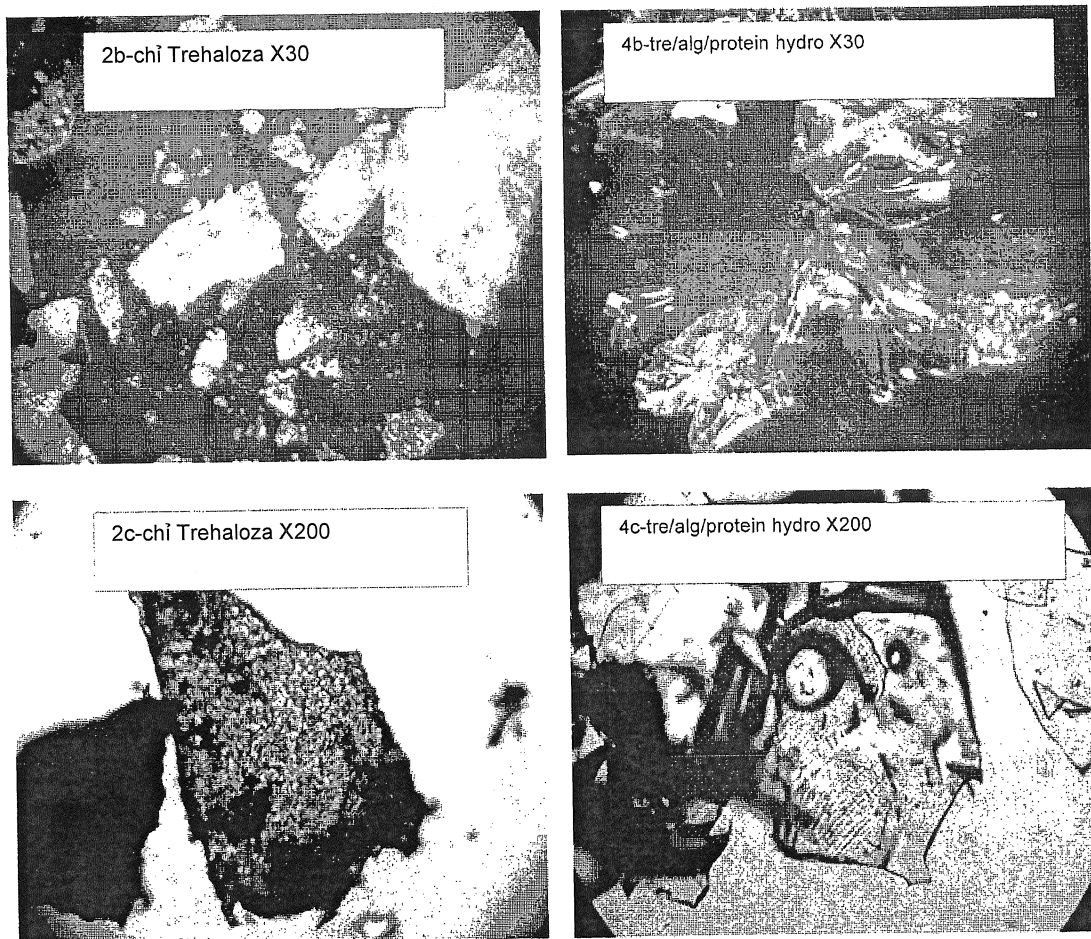


FIG. 8

9/20

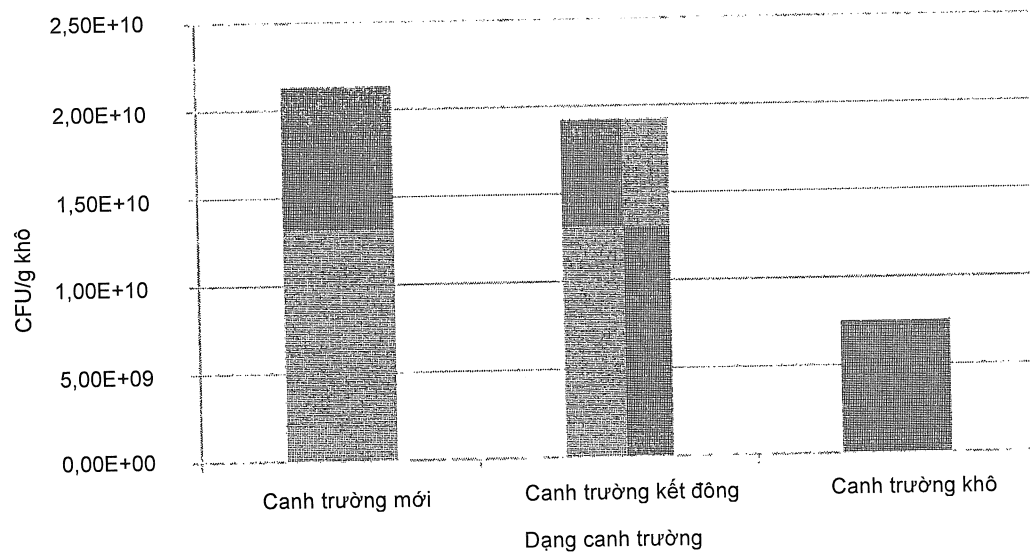


FIG. 9

10/20

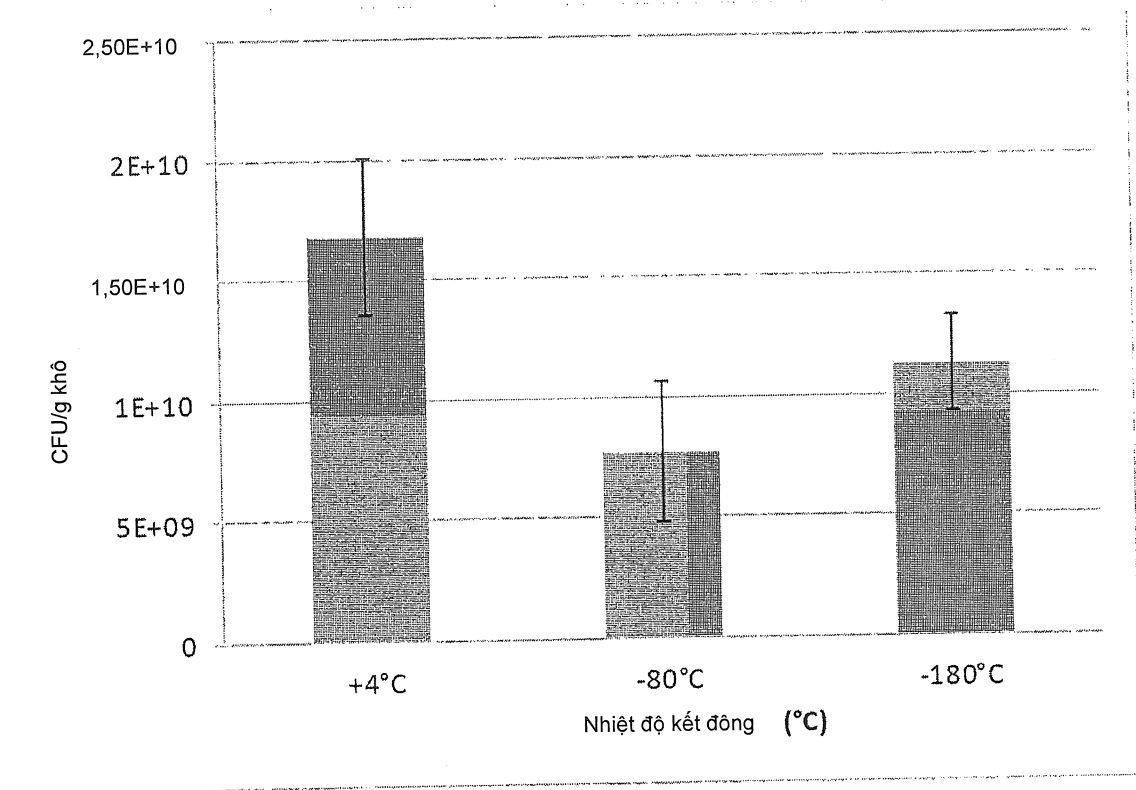


FIG. 10

11/20

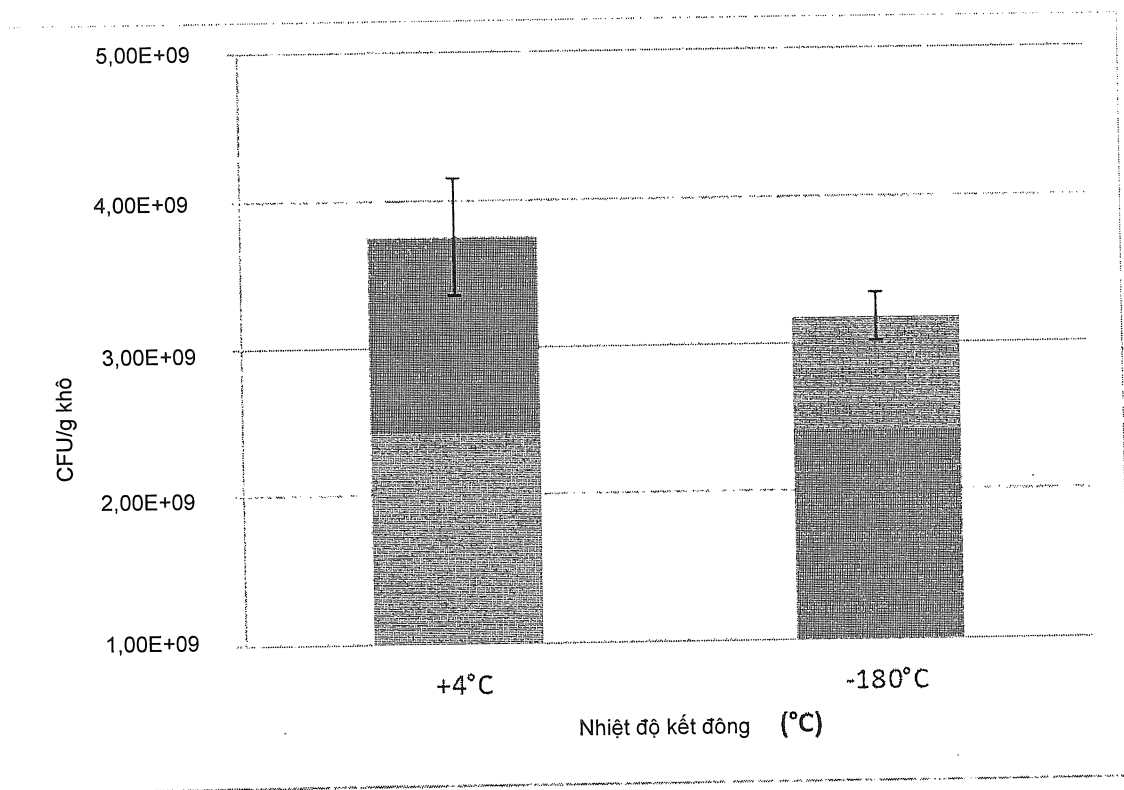


FIG. 11

12/20

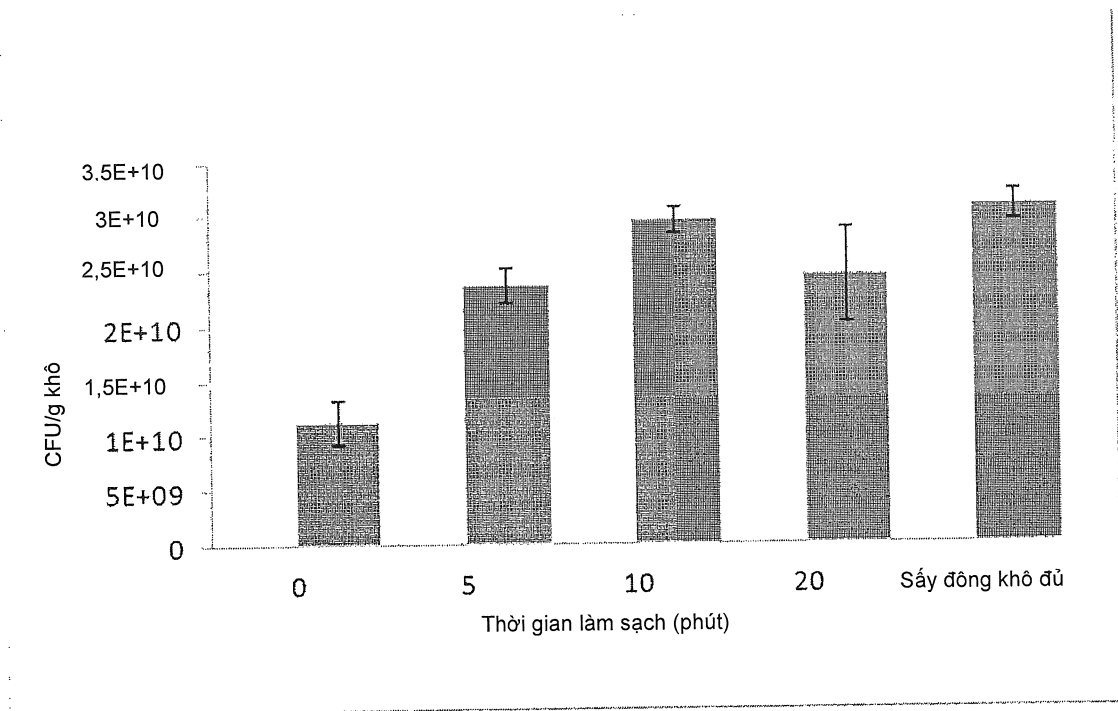


FIG. 12

13/20

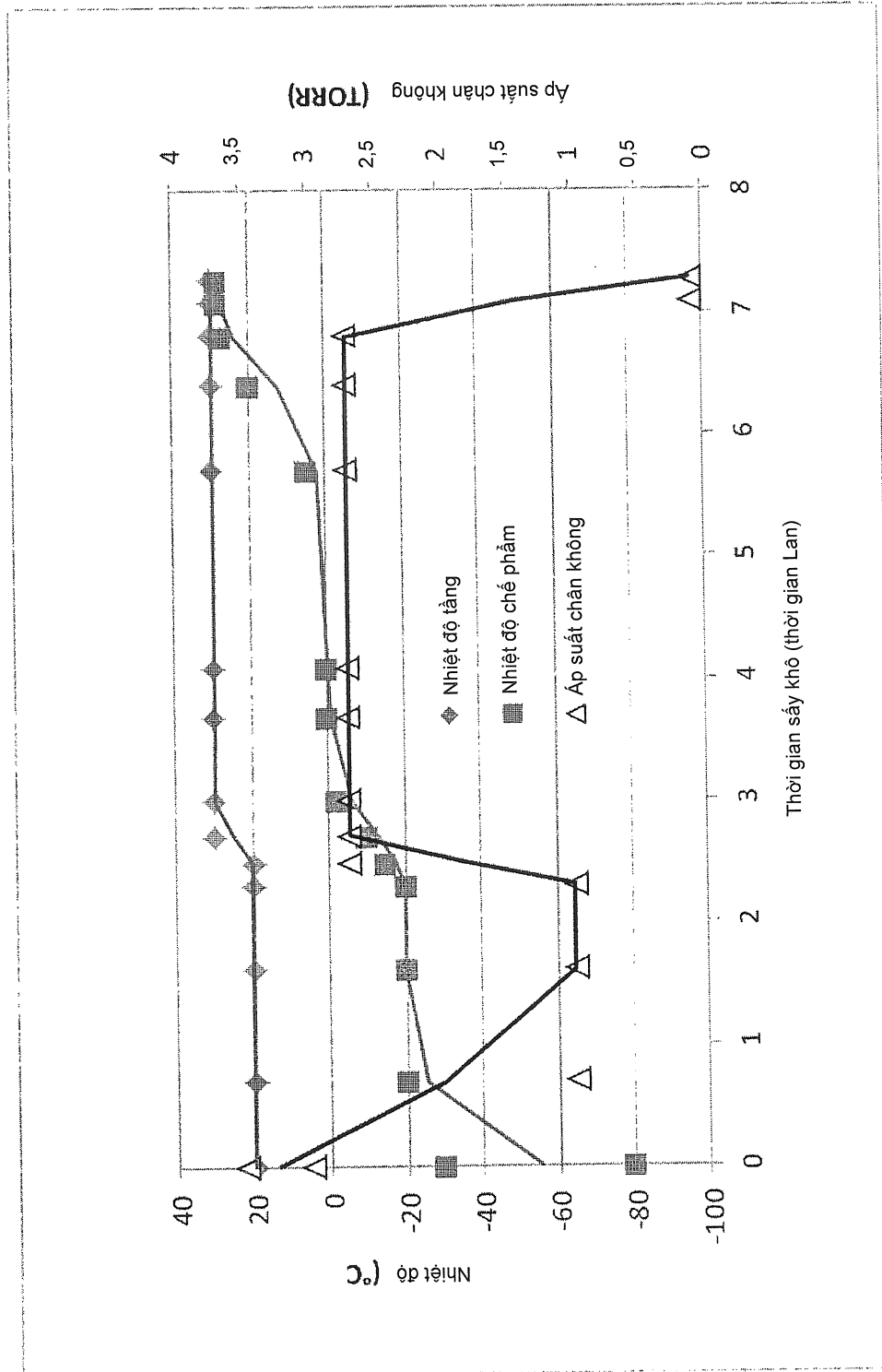


FIG. 13

14/20

Sự giảm *L. rhamnosus* theo quy trình trong khi sấy khô các loại canh trường khác nhau và ở nhiệt độ đông lạnh khác nhau

Loại canh trường	Sự giảm theo hàm Log
canh trường đông lạnh	0,91
Canh trường khô	0,44
Nhiệt độ đông lạnh	
+4°C	0,73
-80°C	0,96
-180°C	0,9

* Sự giảm nhiệt độ đông lạnh được đánh giá trên canh trường vi khuẩn kết đông

** Sự giảm theo quy trình thu được sau khi sấy khô mà không có bước làm sạch bổ sung

FIG. 14

15/20

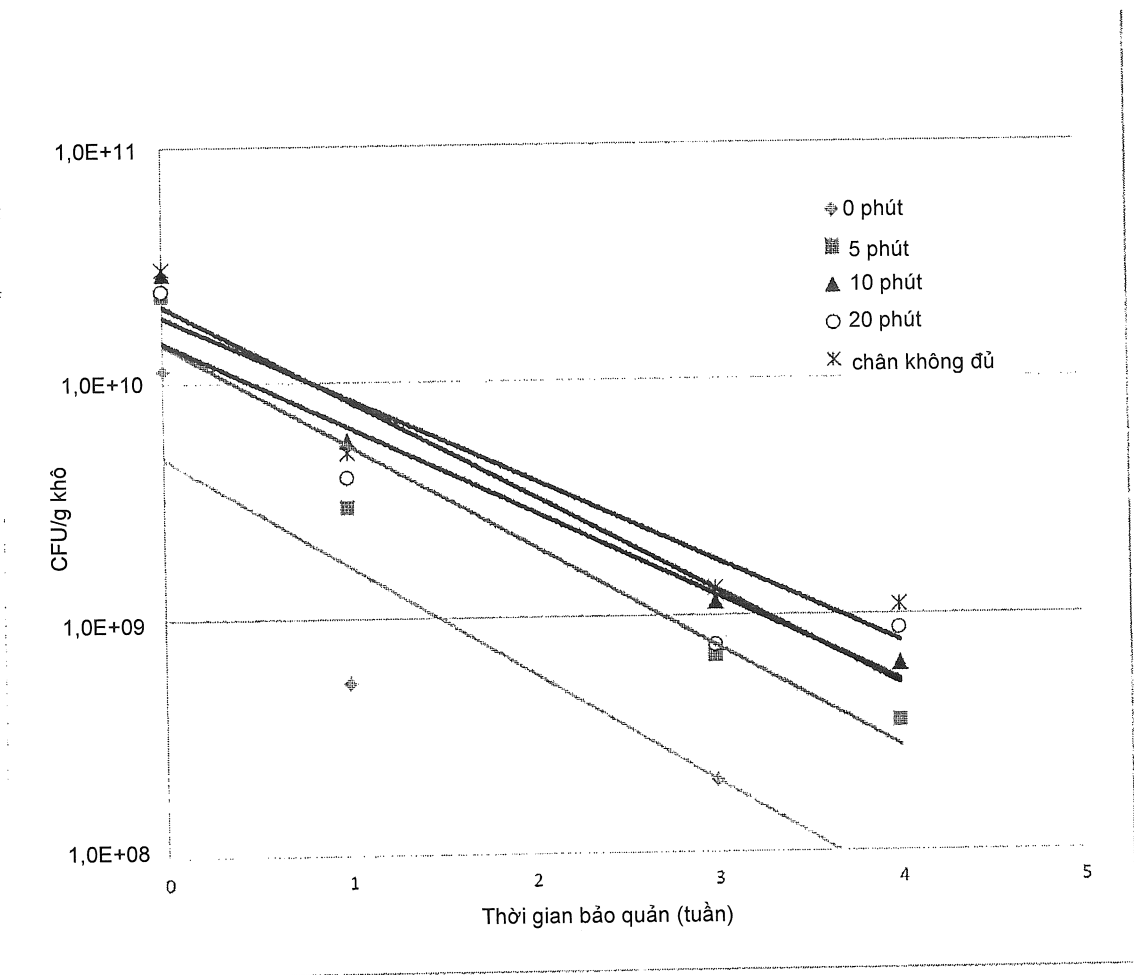


FIG. 15

16/20

Độ ổn định bảo quản ở nhiệt độ 40C và 43% RH của *L. acidophilus* sp. được sấy đông khô thông thường hoặc sau khi bảo chế theo chế phẩm và phương pháp theo sáng chế

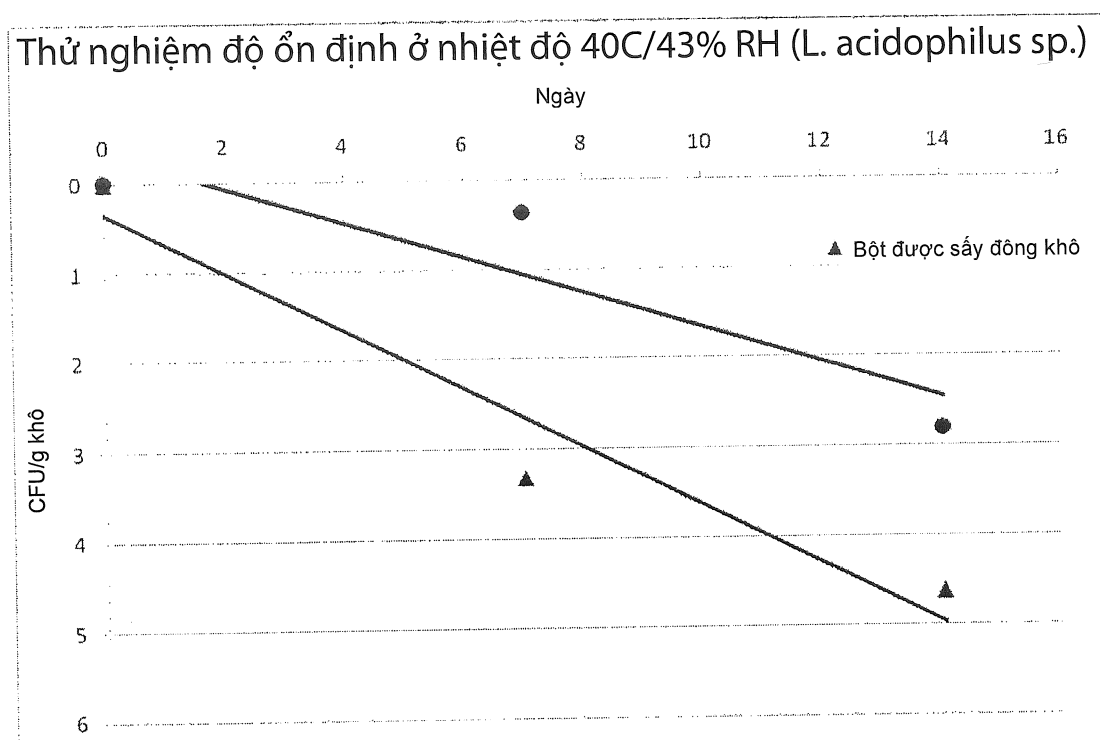


FIG. 16

17/20

Độ ổn định bảo quản ở nhiệt độ 40C và 43% RH và nhiệt độ 30C và 60%RH của *L. rhamnosus* sp. được sấy đông khô thông thường hoặc sau khi bào chế theo chế phẩm và phương pháp theo sáng chế

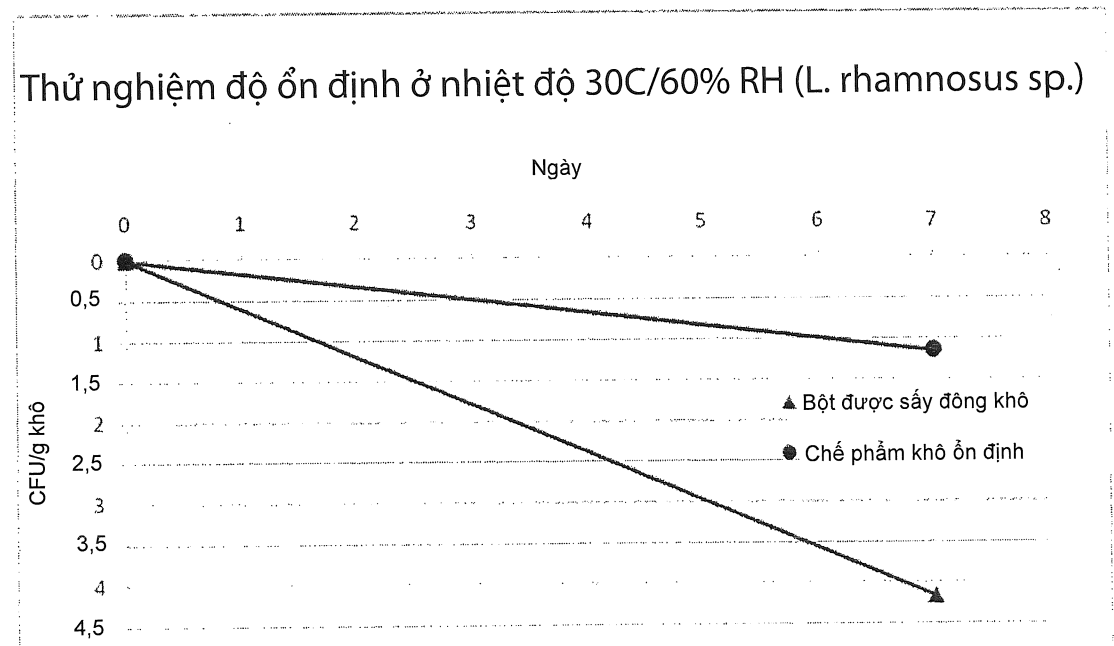
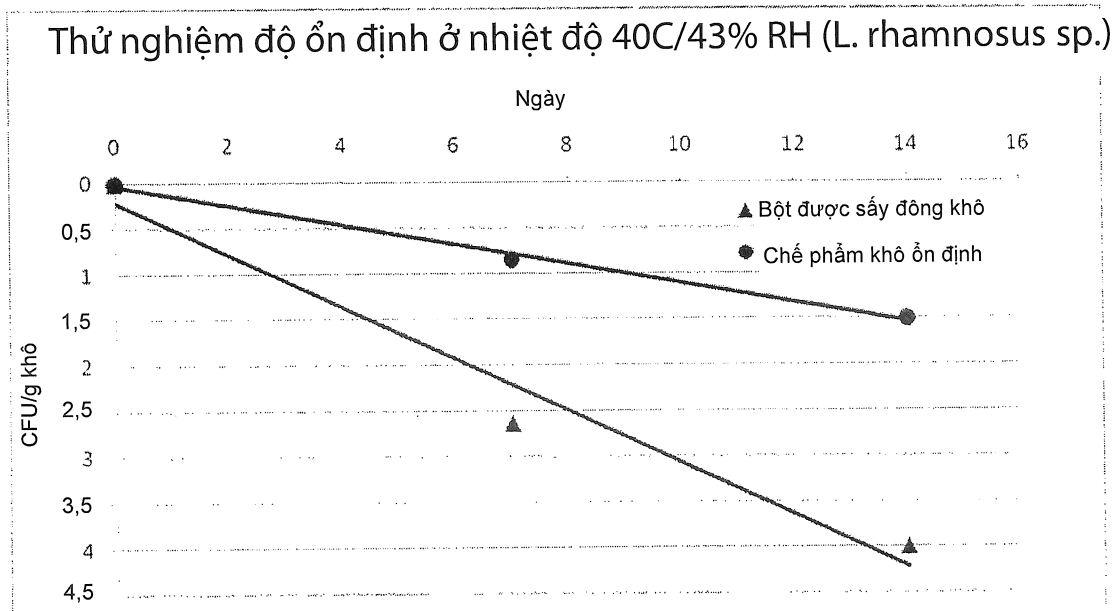


FIG. 17

Tác dụng của sự nén trong máy nén viên đối với khả năng sống và độ ổn định bảo quản ở nhiệt độ 40C và 43% RH của *L. rhamnosus* probiotic được ổn định và được bảo vệ trong chế phẩm theo sáng chế

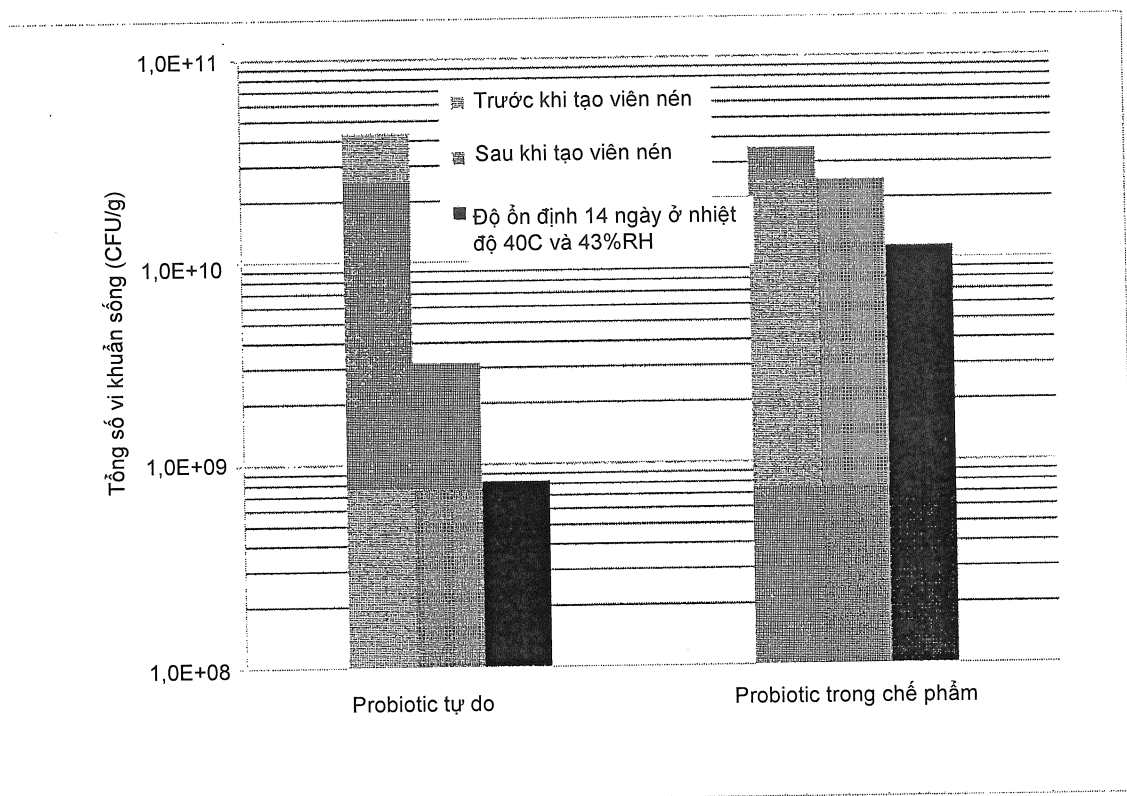


FIG. 18

19/20

Tác dụng tạo viên nén với hỗn hợp của nhiều vitamin và khoáng chất và sự phơi nhiễm bảo quản ở nhiệt độ 40C và 43% RH đối với độ ổn định của vi khuẩn *L. rhamnosus* được ổn định và được bảo vệ trong chế phẩm theo sáng chế

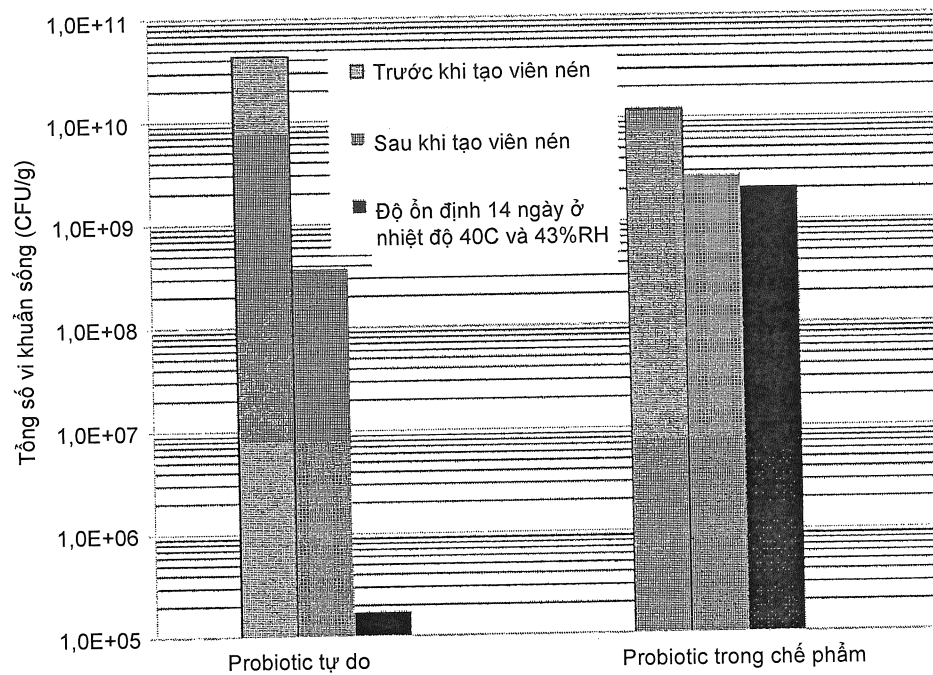


FIG. 19

20/20

Tác dụng của sự nén trong máy nén viên đối với hoạt tính của enzym proteaza và lipaza dưới dạng tự do và được bảo vệ trong chế phẩm theo sáng chế. Các enzym được tạo viên nén riêng hoặc được trộn với lượng bằng nhau và tiếp đó được tạo viên nén

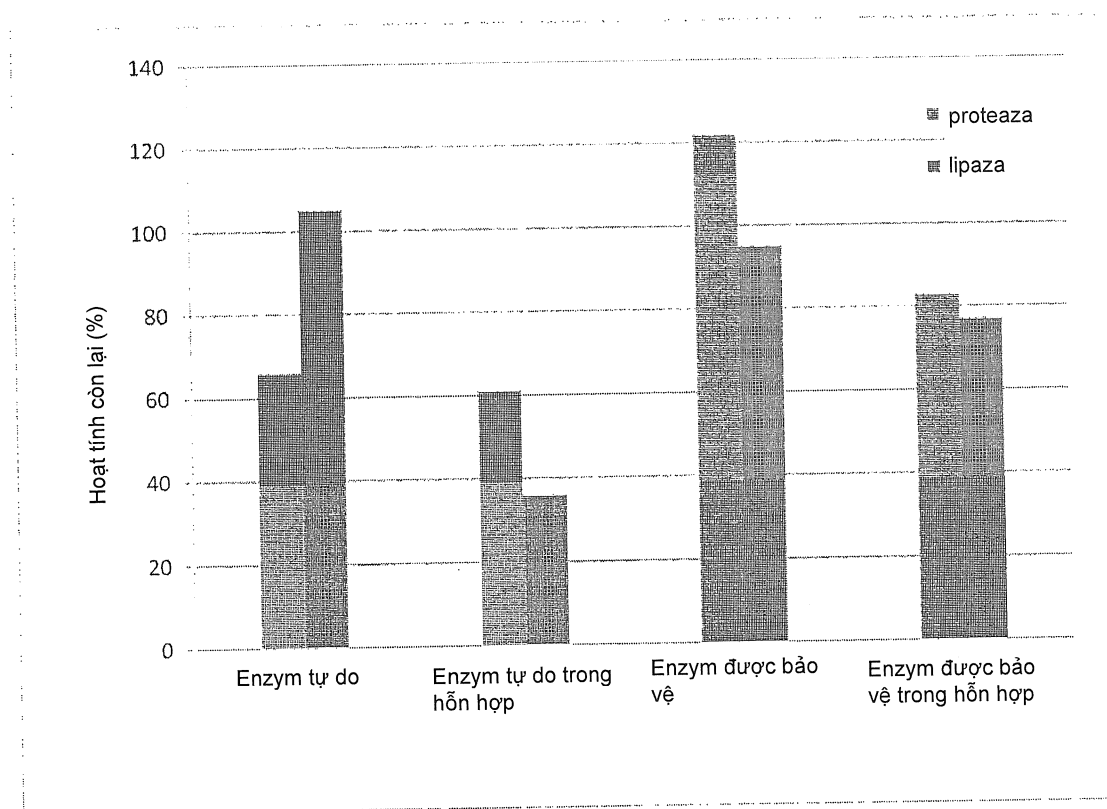


FIG. 20